

Aus der Klinik für Innere Medizin III
Klinische und Experimentelle Medizin
Medizinische Fakultät
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Böhm)

Bedeutung der Histon-Methylierung für die Reaktivierung des fetalen Genprogramms bei chronischer Herzinsuffizienz

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2014

vorgelegt von Marcus Tauchnitz
geb. am 18.08.1984 in Torgau

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
Zusammenfassung	8
Summary	10
1.0 Einleitung	12
1.1 Herzinsuffizienz - ein komplexes Syndrom	12
1.2 Epidemiologie	12
1.3 Systolische und diastolische Herzinsuffizienz	13
1.4 Diagnose der Herzinsuffizienz	14
1.5 Aktivierung des fetalen Genprogramms	14
1.6 Chromatinstruktur und Regulation der Transkription	15
1.7 Ablauf der Transkription und Translation	17
1.8 Euchromatin	18
1.9 Heterochromatin	18
1.10 Modifikationen der Histone	19
1.10.1 Acetylierung der Histone	19
1.10.2 Histon-Deacetylasen (HDACs)	19
1.10.3 HDAC4	19
1.10.4 Methylierung der Histone	22
1.11 SET-Domain	23
1.12 G9A	23
1.13 SUV39H1	23
1.14 Histon-Demethylierung	24
1.15 LSD1	24
1.16 Jumonji Domänen – Proteine	25
1.17 JMJD2A	25
1.18 JMJD1A	26
1.19 H3K9me3 Bindung durch HP1	27
1.20 Zusammenspiel von Acetylierung und Methylierung	28

2.0 Ziele der Arbeit	29
3.0 Methoden	30
3.1 Chromatin Immunopräzipitation	33
3.2 PCR - Polymerase Chain Reaktion	35
3.3 Agarose-Gelelektrophorese	39
3.4 RNA Isolation und Bestimmung für RT-PCR	40
3.5 RT-PCR – Reverse Transkription	41
3.6 Real Time PCR	42
3.7 Working Heart	44
3.8 Statistische Analyse	46
4.0 Geräte	47
4.1 Chemikalien/Kits	48
4.2 Antikörper	49
4.3 Puffer	50
5.0 Ergebnisse	51
5.1 Einfluss der Histon-Methylierung auf die Expression von Hypertrophie-Markergenen bei chronischer Herzinsuffizienz	51
5.1.1 Charakteristische Veränderungen der Genexpression im menschlichen insuffizienten Myokard	51
5.1.2 Herzinsuffizienz ist mit einer veränderten Histon-Methylierung der ANP und BNP Promotorregion assoziiert.	52
5.1.3 H3K4-Methylierung der ANP und BNP Promotorregionen	54
5.1.4 Insuffizientes Myokard zeigt reduzierte HP1-Bindung	56
5.1.5 Unveränderte Expression der Histon-modifizierenden Proteine LSD1, G9a und SUV39H1 bei Herzinsuffizienz	57
5.1.6 Erhöhte mRNA-Expression der Histon-Methyltransferasen JMJD1A und JMJD2A in insuffizientem Myokard	58
5.1.7 JMJD1A/JMJD2A Bindung am ANP-Promotor	59
5.2 Einfluss der Histon-Methylierung auf die Expression von Hypertrophie-Markergenen bei akuter kardialer Vor- und Nachlast	60

5.2.1 Effekte der akuten kardialen Vor- und Nachlast auf die ANP-Expression	60
5.2.2 H3K9-Demethylierung als schnelle epigenetische Veränderung im Myokard	61
5.2.3 Reduzierte HP1-Bindung an die ANP-Promotorregion nach akuter Zunahme der kardialen Vorlast	62
5.3 Einfluss der Histon-Deacetylase 4 auf die Reaktivierung des fetalen Genes ANP	64
5.3.1 Basale Expression von ANP in der HDAC4-KO-Maus	63
5.3.2 Die zentrale Rolle der HDAC4 für die H3K9-Demethylierung	64
5.3.3 HP1-Bindungsverhalten in der HDAC4-KO-Maus	65
6.0 Diskussion	66
6.1 Epigenetische Modifikationen bei chronischer Herzinsuffizienz	66
6.2 Dynamische Regulation der H3K9-Methylierung	71
6.3 Die regulatorische Rolle von HDAC4	71
6.4 Ausblick	73
Literaturverzeichnis	75
Veröffentlichung	88
Abstracts	88
Abbildungsverzeichnis	89
Tabellenverzeichnis	90
Lebenslauf	91
Danksagung	92

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
BNP	B-Typ natriuretisches Peptid (= Brain Natriuretic Peptide)
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosin-5`-Phosphat
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinases
CD-1	Mausstamm CD-1
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChIP	Chromatin-Immuno-Präzipitation
CREB	cAMP-Response-Element-Binding Protein
CRM1	chromosome region maintenance 1 protein
CtBP	C-terminal Binding Protein
C-Terminus	Carboxyl-Terminus einer Desoxyribonukleinsäure
CoA	Coenzym A
CSD	chromo shadow-domain
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DHF	diastolische Herzinsuffizienz
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnmt	Mammalian DNA methyltransferase
dot1	disrupter of telomere silencing protein 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDPVR	end-diastolische Druck-Volumen Beziehung
ESPVR	end-systolische Druck-Volumen Beziehung
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
x g	x Erdbeschleunigung
GST	Glutathion S-Transferase
G9A	= EHMT2 (euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2)
h	Stunde
HAT	Histon Acetyltransferase
HCN4	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4
HDAC	Histon Deacetylase
HDLBP	High density lipoprotein-binding protein (vigilin)
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinmethan]-sulfonsäure
HI	Herzinsuffizienz
HMT	Histon Methyltransferase
HP1	Heterochromatinprotein 1
H1	Histon 1
H2A	Histon 2A
H2B	Histon 2B
H3	Histon 3
H3K4	Histon 3 Lysinrest 4
H3K9	Histon 3 Lysinrest 9
H4	Histon 4
ICM	ischämische Kardiomyopathie
IE	internationale Einheit
JHDM	JmjC domain-containing family of histone demethylases
JMJ	Jumonji Domain
JMJD2A	Jumonji Domain 2A
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LVEDP	left ventricular end diastolic pressure
LSD1	lysine specific demethylase 1
M	Mol
MEF2	myocyte enhancer factor-2

MeCP2	methyl-CpG-binding protein 2
MHC-Beta	myosin heavy chain- Beta
mRNA	messenger RNA
MyoD	myogenic differentiation 1
NAD+	Nicotinamidadenindinukleotid
NLS	nuclear localisation sequence (Kernlokalisationssignal)
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PBS	Phosphate-buffered saline
Pc	Polycomb
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PHD	plant homeodomains
PKD	Protein Kinase D
PMSF	Phenylmethylsulphonylflourid
p53	protein 53
RB1	Retinoblastom-Protein
REST	RE-1-silencing transcription factor
RNA	Ribonukleisäure
rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
Serca	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SET	<u>S</u> u(var), <u>E</u> nhancer of zeste, <u>T</u> rithorax
SHF	systolic heart failure
SiR2	Sirtuin-2
Trx	Trithorax
TSA	Trichostatin A
U	Unit
UAS	upstream activation sequence
µg	10 ⁻³ Milligramm
µl	10 ⁻³ Milliliter

Zusammenfassung

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz kommt es zur Reaktivierung des fetalen Genprogramms einschließlich der protektiv wirkenden natriuretischen Peptide, ANP und BNP. Dieses Genprogramm ist einerseits Indikator für das maladaptive Remodeling des linken Ventrikels im Verlauf der Erkrankung, andererseits ist es Teil des Progress, da auch minder kontraktile Elemente wie fetales Myosin Heavy Chain-Beta (MHC-Beta), fetales alpha Skeletal Aktin (aSka) und Myosin-bindendes Protein C vermehrt exprimiert werden. Die Mechanismen, die diese Reaktivierung regulieren, sind jedoch nicht gänzlich verstanden. Eine entscheidende Rolle für die Expression der fetalen Gene spielt die Konformation des Chromatins. Sie wird beeinflusst durch Histonmodifikationen, wie zum Beispiel die Histonacetylierung und Methylierung. Diese Modifikationen, auch als "Histon-Code" bezeichnet, regeln die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren. In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der Reexpression fetaler Gene und der Modifizierung des "Histon-Codes" in den Promotorregionen von ANP und BNP in menschlichem insuffizienten Myokard analysiert und mit gesundem Spendermyokard verglichen.

Im terminal insuffizienten Myokard konnte eine Abnahme der Di- und Trimethylierung von H3K9 in den Promotorregionen von ANP und BNP belegt werden, bei gleichzeitig gesteigerter Expression dieser Gene. Ebenso wurde eine Abnahme der Bindung des Repressorproteins Heterochromatin Protein 1 (HP1) an die Promoterregionen dieser Gene festgestellt; welches spezifisch mit dem trimethylierten Lysinrest 9 des Histons 3 (H3K9me3) interagiert. Zudem konnte eine erhöhte Expression der H3K9-spezifischen Histondemethylasen JMJD1A und JMJD2A im Myokard von Patienten mit dilatativer und ischämischer Kardiomyopathie nachgewiesen werden, sowie eine verstärkte Rekrutierung der JMJD2A an die ANP Promotorregion bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie.

Um den Einfluss einer erhöhten kardialen Vorlast, wie sie bei Herzinsuffizienz auftritt, auf die Chromatin Modifikationen zu untersuchen, wurden „Working Heart“ Experimente durchgeführt. Unter einer erhöhten kardialen Vor- und Nachlast konnten wir bereits nach 60 min eine gesteigerte Genexpression von ANP gegenüber der Kontrollgruppe mit physiologischen Lastbedingungen detektieren, begleitet von einer deutlichen Abnahme der H3K9 Trimethylierung in der Promotoregion von ANP sowie eine Dissoziation von HP1 von der Promoterregion von ANP.

Es ist bekannt, dass die Histon Deacetylase 4 (HDAC4) einen Repressorkomplex mit HP1 und anderen Histon-modifizierenden Proteinen bilden kann, unter anderem auch mit der Histon-Methyltransferase SUV39H1. In Versuchen an Mäusen mit Herz-spezifischer Deletion von HDAC4 (HDAC4-KO) war die ANP Expression gegenüber der Wildtyp- (WT-) Kontrollgruppe erhöht. Während es in WT Mäusen nach erhöhter kardialer Vorlast zu einer Abnahme der H3K9 Methylierung in der Promotorregion von ANP, einer Abnahme der Bindung von HP1 an die

Promoterregion und konsekutiv einer Zunahme der ANP Expression kam, waren diese Effekte in HDAC4-KO Mäusen aufgehoben oder sogar paradox gegenläufig reguliert.

Die Daten der vorliegenden Arbeit suggerieren daher, dass bei chronischer Herzinsuffizienz epigenetische Modifikationen, insbesondere die Regulation der H3K9-Methylierung in der Promoterregion von ANP, eine entscheidende Rolle bei der Reexpression dieses fetalen Gens spielt. Diese Modifikation wird dynamisch durch akute hämodynamische Veränderungen getriggert und kausal durch HDAC4 kontrolliert. Die Daten geben neue Einsichten in die epigenetische Regulation fetaler Gene und sind ein Ansatzpunkt für neuartige Therapien zur Beeinflussung kardialer Remodelingprozesse, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Hohl M, Wagner M, Reil JC, Müller SA, Tauchnitz M, Zimmer AM, Lehmann LH, Thiel G, Böhm M, Backs J, Maack C. HDAC4 controls histone methylation in response to elevated cardiac load.

J Clin Invest. 2013;123:1359-1370.

Summary

In patients with heart failure, reactivation of the fetal gene programme, including the natriuretic peptides ANP and BNP, is an indicator of the maladaptive remodeling of the left ventricle in the course of the disease. It is also part of the progress that involves the upregulation of less efficient contractile proteins, such as MHC-beta and myosin binding protein C. The mechanisms regulating this reactivation are incompletely understood. A crucial role for the expression of fetal genes is played by the conformation of chromatin. It is influenced by histone modifications, such as histone acetylation and methylation. It is thought that this "histone code" controls the accessibility of the DNA for transcription factors.

In terminally failing left ventricular myocardium, a decrease in H3K9 di- and trimethylation in the promoter regions of ANP and BNP was observed, while the respective gene expression was increased. Accordingly, heterochromatin protein 1 (HP1), which is known to specifically bind to trimethylated H3K9, dissociated from the promoter region of ANP. Furthermore, an increased expression of H3K9-specific histone demethylases JMJD1A and JMJD2A was observed in myocardium from patients with ischemic or dilated cardiomyopathy. The recruitment of JMJD2A to the promoter region of ANP was increased in patients with ischemic, but not dilated cardiomyopathy. To investigate whether the epigenetic changes observed in chronic heart failure could be triggered by hemodynamic changes that occur in failing hearts, experiments on isolated mouse hearts operating in a "Working heart" modus were performed. Increasing cardiac preload from 10 to 30 mmHg or afterload from 80 to 120 mmHg led to an upregulation of ANP gene expression within 60 min. This upregulation was associated with a decrease of H3K9 trimethylation in the promoter region of ANP and the dissociation of HP1 from the promoter region of ANP. These epigenetic modifications could relax the chromatin structure in these gene regions, presumably facilitating the access of transcription factors to the promoter regions.

To understand the factors that control H3K9 methylation from upstream, the involvement of histone deacetylases 4 (HDAC4) was examined. HDAC4 is normally thought to control histone acetylation, however, previous in vitro data suggested that HDAC4 may also control H3K9 methylation status through interaction with the histone methyltransferase SUV39H1 and HP1. In fact, in mice with cardiac-specific deletion of HDAC4 (HDAC4-KO), basal ANP expression was slightly elevated compared to wild-type (WT) littermate control mice. Elevating cardiac preload led to a decrease of H3K9 trimethylation and HP1 binding to the promoter region of ANP in WT mice, while in HDAC4-KO mouse hearts, these effects were prevented or even regulated in the opposite direction.

These data suggest that in patients with chronic heart failure, epigenetic modifications in the promoter region of ANP contribute to the re-expression of this fetal gene. These modifications occur dynamically in response to changes of hemodynamic load, a critical hallmark of heart failure,

and are controlled decisively by HDAC4. These data provide novel insights into the epigenetic regulation of fetal genes in heart failure and could present potential targets for therapeutic intervention to prevent maladaptive cardiac remodelling in the course of the disease.

Parts of this project were already published:

Hohl M, Wagner M, Reil JC, Müller SA, Tauchnitz M, Zimmer AM, Lehmann LH, Thiel G, Böhm M, Backs J, Maack C. HDAC4 controls histone methylation in response to elevated cardiac load.

J Clin Invest. 2013;123:1359-1370.

1.0 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz - ein komplexes Syndrom

Die Herzinsuffizienz (HI) ist ein komplexes Syndrom und typischerweise durch folgende klinische Symptome gekennzeichnet: Müdigkeit, Anzeichen einer Flüssigkeitsretention wie Lungenstauung und daraus resultierender Luftnot mit vermehrter Atemarbeit in Ruhe oder unter Belastung, Gelenkschwellungen, periphere Ödeme, jugular-venöse Stauung, Hepatomegalie sowie andere objektive Hinweise auf eine Störung der Struktur oder Funktion des Herzens in Ruhe (ESC Guidelines 2008, 2012).

1.2 Epidemiologie

Von 1998 bis 2007 war die Herzinsuffizienz die dritthäufigste Todesursache in Deutschland und verursacht enorme Kosten für das Gesundheitssystem. Als Vorläufer von symptomatischer Herzinsuffizienz gehen auch asymptomatische strukturelle oder funktionelle Anomalien des Herzens mit einer erhöhten Mortalität einher (McDonagh *et al.*, 1997). Die Prävalenz in der Altersgruppe der 70- bis 80-Jährigen liegt zwischen 10% und 20%, die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 50%. Bei den über 80-Jährigen waren 141.000 Menschen allein im Jahre 2006 in Deutschland von dieser Krankheit betroffen, bis zum Jahr 2050 wird sich diese Zahl auf schätzungsweise 353.000 erhöhen. Die Kosten, die da durch hervorgerufen werden, liegen im Bereich von 1-2% der direkten Krankheitskosten in den westlichen Industrienationen. Für Deutschland waren es 2006 ca. 2,9 Milliarden Euro (Neumann *et al.*, 2009).

1.3 Systolische und diastolische Herzinsuffizienz

Eine Unterteilung in systolische und diastolische Herzinsuffizienz ist möglich, aber sie sollten nicht unabhängig voneinander betrachtet werden (Brutsaert *et al.*, 2006). Die systolische HI ist charakterisiert durch ein exzentrisches Remodeling mit Zunahme des enddiastolischen Volumens und Abnahme des Verhältnisses von Wanddicke zum Radius. Eine Verminderung des Schlagvolumens, der Auswurf-Fraktion (EF) und der geleisteten Schlagarbeit sind ebenfalls typisch für diese Form der Herzinsuffizienz (Aurigemma *et al.*, 2006). In der diastolischen Herzinsuffizienz ist die EF des linken Ventrikels in Ruhe nicht reduziert. Allerdings besteht eine erhöhte passive Steifigkeit, die zu einer eingeschränkten Relaxation des Ventrikels und somit zu einer Störung in der Füllungsphase und einem erhöhten end-diastolischen Druck führt (Zile *et al.*, 2004). Patienten mit diastolischer Herzinsuffizienz weisen in der Regel eine konzentrische Hypertrophie auf. Auch das strukturelle Remodeling auf mikroskopischer Ebene unterscheidet sich in beiden Formen. Bei der diastolischen Herzinsuffizienz zeigen die Kardiomyozyten einen vergrößerten Durchmesser. Außerdem kommt es zu einer Steigerung des Kollagengehaltes. In der dilatativen Kardiomyopathie, die mit einer verminderten systolischen Funktion einhergeht, zeigt sich eine Zunahme der Myozytenlänge und eine Verminderung der extrazellulären Matrix (Aurigemma *et al.*, 2006). Ein gemeinsames Merkmal beider Herzinsuffizienzformen ist ein erhöhter linksventrikulärer enddiastolischer Füllungsdruck (LVEDP). Der LVEDP korreliert mit der Vorlast und dem enddiastolischen Volumen im Ventrikel. Ein anschauliches Bild dazu lieferte Aurigemma *et al.* im Jahr 2006 (Abb. 1). Die gesunde Kontrollgruppe ist als durchgezogene, die systolische (SHF) als gestrichelte und die diastolische (DHF) Herzinsuffizienz als gepunktete Linie dargestellt.

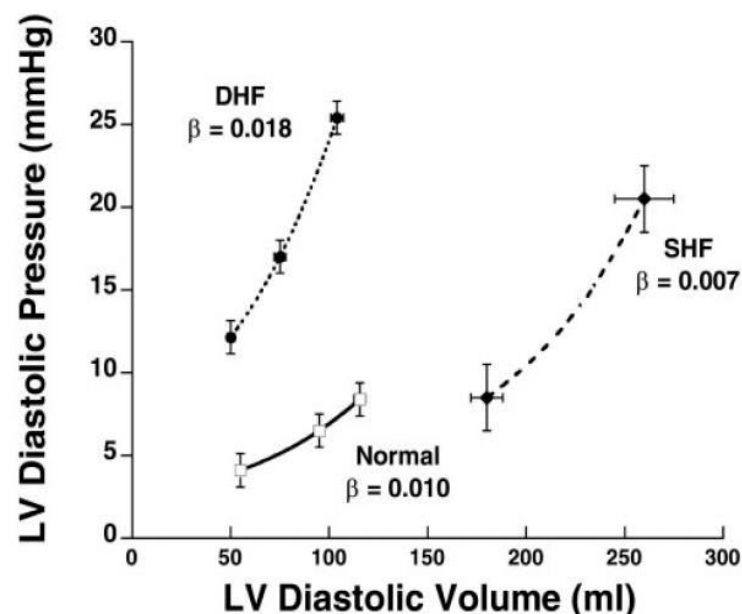


Abbildung 1 LV diastolische Druck-Volumen-Beziehung

Dargestellt ist die exponentielle Steifigkeitskonstante (β) als Maß der passiven Steifigkeit des linken Ventrikels. Der LVEDP ist bei Patienten mit SHF und DHF gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

Bildquelle: Aurigemma *et al.*, 2006

1.4 Diagnose der Herzinsuffizienz

Symptome und Anzeichen der Herzinsuffizienz sind der Schlüssel zur Früherkennung. Meist führen der klinische Verdacht nach der körperlichen Untersuchung und die Anamnese zur weiteren Diagnostik. So sollten bei jedem Patienten mit Verdacht auf Herzinsuffizienz ein Elektrokardiogramm (EKG) und ein Röntgen des Thorax (in zwei Ebenen) durchgeführt werden, um Kardiomegalie, Lungenstauung und/oder Pleuraergüsse zu erkennen. Die Echokardiographie ist eine weitere schnell verfügbare, nicht-invasive und sichere Diagnostik. Sie liefert umfangreiche Informationen zur Herzanatomie (Volumen, Geometrie, Masse), den Klappenfunktionen und den Wandbewegungen. Echokardiographisch ist die Unterscheidung zwischen Patienten mit systolischer Dysfunktion und Patienten mit erhaltener systolischer Funktion möglich.

Zur Routine-Diagnostik, die bei Patienten mit Verdacht auf HI durchgeführt werden sollte, gehören ein komplettes Blutbild, die Messung der Serum-Elektrolyte, der Glucose und der Leberwerte sowie die Bestimmung der Nierenfunktion mit Hilfe des Serumkreatinins, der GFR und der Urinanalyse (ESC Guidelines 2008, 2012). Vor allem die natriuretischen Peptide BNP bzw. das NT-pro BNP sind nützliche Biomarker in der Diagnostik. BNP ist ein Hormon, das überwiegend durch die Ventrikel sezerniert wird, es erreicht sehr hohe Plasmakonzentrationen bei Patienten mit chronischer und akuter Herzinsuffizienz. BNP wird als Reaktion der Herzwand auf Distension, Dehnung sowie neurohormonaler Aktivierung synthetisiert. Sezernierte natriuretische Peptide führen zur Natriuresis durch Vasodilatation der Nierengefäße, bei gleichzeitiger Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems und adrenerger Aktivierung (Palazzuoli *et al.*, 2010). Das Potential von BNP bzw. NT-pro BNP geht aber noch weit über die Diagnostik hinaus. Sie erlauben eine Verlaufskontrolle der Therapie und eine Abschätzung des Risikos für klinische Ereignisse. Durch sie wird auch eine Ausschlussdiagnose ermöglicht, da eine normale Konzentration eines unbehandelten Patienten mit einem hohen negativen prädiktiven Wert korreliert (Maisel *et al.*, 2002).

1.5 Aktivierung des fetalen Genprogramms

Unter dem fetalen Genprogramm versteht man eine Gruppe von Genen, die während der Embryonalentwicklung von Bedeutung sind und aktiv transkribiert werden, dann aber im adulten Herzen abgeschaltet werden und inaktiv vorliegen. Bei der Entstehung der Herzinsuffizienz kommt es zu einer Re-Aktivierung des fetalen Genprogramms, die mit Umbauprozessen des linken Ventrikels (LV) im Sinne einer Hypertrophie assoziiert sind (sog. kardiale Remodeling-Prozesse). Die LV Hypertrophie kann dabei im längeren Verlauf in eine LV Dilatation übergehen. Dieser Übergang von LV Hypertrophie zur Dilatation ist meist mit einer Verschlechterung der systolischen Funktion assoziiert. Die Ursachen für den Übergang von Hypertrophie zur Dilatation mit kontraktile Dysfunktion sind nicht vollständig verstanden und Gegenstand intensiver Forschung.

Die Remodeling-Prozesse spiegeln sich in einer geänderten Genexpression von Proteinen, die in die Regulation des myozytären Ca^{2+} Haushalts involviert sind, wie dem Ryanodine Rezeptor 2 (RyR2) und der Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) Ca^{2+} ATPase (SERCA), wieder (Wang *et al.*, 2011). Folgen sind eine Reduktion der SR Ca^{2+} Beladung und somit eine Verringerung des cytosolischen Ca^{2+} Transienten während eines Aktionspotenzials, was in einer reduzierten Kontraktilität resultiert (Kubo *et al.*, 2001). Man ist der Auffassung, dass die Dysregulation der Ca^{2+} Homöostase ein zentraler Aspekt der systolischen und diastolischen Dysfunktion ist (Harris DM *et al.* 2005). Molekularbiologisch ist weiterhin eine „Heraufregulation“ und Modifikation von minder kontraktile Elementen, wie Skelettmuskulatur- α -Aktin, Myosin Heavy Chain Beta (MHC- β), Myosin bindendes Protein C (cMyBP-C) und Troponin I (Copeland *et al.*, 2010; Boontje *et al.*, 2011) charakteristisch. Darüber hinaus werden auch Gene vermehrt transkribiert, die sich protektiv auswirken und sehr eng mit dem Grad der Insuffizienz korrelieren. Dies sind beispielhaft die natriuretischen Peptide ANP und BNP (Maisel *et al.*, 2002; Miettinen *et al.*, 2008). Das Herzhormon atriales natriuretisches Peptid (ANP) ist maßgeblich an der Regulation des arteriellen Blutdrucks und intravaskulären Volumens beteiligt und beeinflusst die Permeabilität von Endothelzellen (Kuhn M, 2012). ANP und BNP entfalten eine ähnliche natriuretische Wirkung. ANP, als Marker für das Remodeling, besitzt eine enorme prognostische Bedeutung für Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (Gottlieb *et al.*, 1989). Ein erhöhtes Plasma-BNP ist jedoch ein sensitiverer Marker für eine linksventrikuläre systolische Dysfunktion, diastolische linksventrikuläre Dysfunktion und linksventrikuläre Hypertrophie als das C-terminale ANP oder N-terminale ANP-(1-30) bei Patienten mit Verdacht auf eine Herzerkrankung (Yamamoto K *et al.*, 1996)

1.6 Chromatinstruktur und Regulation der Transkription

Der Chromatinstruktur kommt bei der Transkriptionskontrolle eine herausragende Rolle zu. Chromatin besteht aus Nucleohiston-Proteinen, Strukturkomponenten des Nukleus und den Nukleosomen. Es kann als Komplex aus eukaryotischer DNA mit den zugehörigen DNA-Bindeproteinen zusammengefasst werden. Das Nukleosom besteht wiederum aus den Histonen und der darum gewundenen DNA. Die Histone sind aus mehreren Untereinheiten zu einem Oktamer zusammengefügt. Dieses Oktamer setzt sich aus je 2 H2A/H2B Dimeren und einem H3/H4 Tetramer zusammen, worum sich wiederum 146 DNA-Basenpaare winden (Abb. 2).

Dieser Protein-DNA-Komplex wird nochmals durch das Histon H1 zum sogenannten „Supercoil“ komprimiert. Die enge Interaktion findet an 14 Kontaktpunkten der DNA mit den Histonen statt (Luger K *et al.*, 1997).

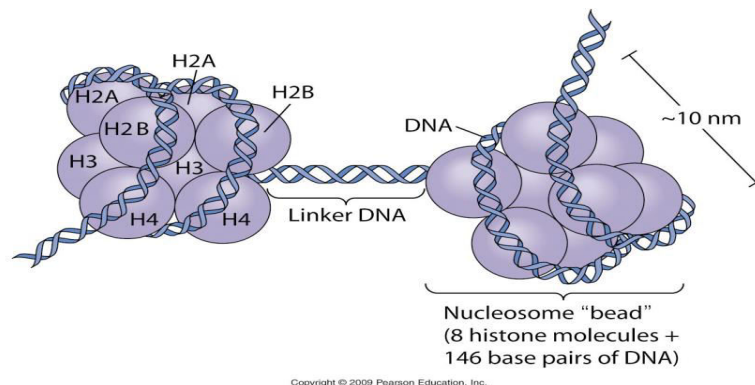


Abbildung 2 Struktur des Nukleosomens

Bildquelle: <http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-18/1820.jpg>

Sie wird durch die positive Ladung der Histone und die negative Ladung der DNA, welche durch die Phosphat-Gruppen entsteht, gewährleistet. Die Abschnitte der nicht-kodierenden DNA heißen Introns, während die kodierenden Sequenzen als Exons bezeichnet werden (Knapp G *et al.*, 1978). In beiden Gruppen befinden sich außerhalb der kodierenden Bereiche sogenannte „leader and trailer“-Abschnitte, eine Art Vor- und Nachspann, sowie eine Vielzahl von Sequenzen, die der Transkriptionskontrolle dienen. Gene, die für Proteine kodieren und deren Transkription durch RNA-Polymerase (Pol) II durchgeführt wird, werden „Struktur-Gene“ genannt. Eine Sequenz am 5'-Ende der kodierenden Sequenz (auch "upstream" genannt) bildet den Promotor. Als Kern-Promotor wird die minimale DNA-Region definiert, die ausreichend ist, um eine niedrige aktivatorunabhängige (basale) Transkription durch die Pol II *in vitro* einzuleiten (Gross und Oelgeschläger, 2006). Der Kern-Promotor oder auch „Core“-Promotor genannt, besteht aus der TATA-Box, die etwa 35 bp upstream vom Transkriptionsstart liegt und dem Initiator-Element direkt am Transkriptionsstart (Smale und Kadonaga, 2003). Für die Ausbildung eines Präinitiationskomplexes und die Initiation der Transkription am Kern-Promotor werden weiterhin generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs) benötigt (Segall *et al.*, 1980; Zawel und Reinberg, 1993). In Wirbeltieren werden nur etwa ein Drittel der Gene von Kern-Promotoren gesteuert. Die Mehrheit der Gene wird von größeren, den BR (breite Verteilung)-, MU (multimodalen)- und PB (breit mit dominanten Peak)-Promotoren reguliert. Die Transkriptionsstartstellen sind bei diesen Promotoren über einen breiten Bereich von typischerweise 50 bis 100 Nukleotiden verteilt. Es gibt noch alternative Promotoren und differenziert-regulierte Promotoren, die Hunderte oder Tausende von Nukleotide voneinander und der Transkriptionsstartstellen entfernt sein können (Juven-Gershon *et al.*, 2008). Histon-Modifikationen in der Promotorregion beeinflussen maßgeblich die Genexpression (Haddad *et al.*, 2010) (siehe 1.10).

1.7 Ablauf der Transkription und Translation

Die Transkription beschreibt die Übersetzung der Information, die auf DNA-Ebene vorliegt, in eine andere Nukleotid-Form, die RNA. Dabei entsteht ein zum DNA-Strang komplementäres RNA-Molekül, das als mRNA (messengerRNA) bezeichnet wird. Die Transkription ist ein komplexer Vorgang, bei dem zuerst die DNA-Helix durch eine ganze Reihe von Proteinen geöffnet wird. Die freigelegten DNA-Stränge werden dann von 3'-Ende in Richtung 5'-Ende abgelesen, dabei entsteht ein RNA-Sense-Strang, dieser wird vom 5'- zum 3'-Ende synthetisiert. Dieses mRNA-Molekül trägt die Informationen für die entsprechende Aminosäure-Sequenz. Der Übersetzungsprozess von der RNA zum Protein wird als Translation bezeichnet. Er erfolgt in Eukaryoten außerhalb des Zellkerns an den Ribosomen im Zytoplasma und beginnt am sogenannten Startcodon. Die Aminosäuren werden durch eine weitere Klasse von RNA, der tRNA (Transfer RNA), die sich wieder komplementär anlagert, bereitgestellt. Hierbei besitzt jede Aminosäure eine tRNA, die sich komplementär am Anti-Codon der mRNA anlagert. Um die Translation zu initiieren, ist ein Komplex aus mRNA, Ribosom, tRNA und zahlreichen assoziierten Proteinen nötig. Es folgt die Elongation, in der weitere Aminosäuren angefügt werden. Der Elongationsprozess lässt sich in mehrere Schritte unterteilen: der Codon-Erkennung, der Ausbildung der Peptidbindung und der Translokation in 3'-Richtung auf der mRNA. Folgt ein Stopp-Codon, so wird die Translation beendet, das Peptid verlässt das Ribosom und der Translationskomplex dissoziiert in seine Untereinheiten (Passarge E, 2001). Bei den transkribierten Proteinen unterscheidet man zwischen "Housekeeping-Proteinen", welche in allen Zelltypen exprimiert werden und Proteinen, die in differenzierten Zelllinien für spezielle Funktionen benötigt werden (Pritchard und Korf, 2003).

Die Transkription durch die RNA-Polymerase II wird durch dynamische Veränderungen im Chromatin einschließlich der Anlagerung und Entfernung von Nukleosomen oder die kovalente Modifikation von Histon-Untereinheiten begleitet (Kim *et al.*, 2007). Dabei werden H2A/H2B und H3/H4 aktiv während der Transkription ersetzt, jedoch mit unterschiedlicher Kinetik: H2A/H2B wird häufiger und H3/H4 wird weniger häufig ausgetauscht (Kimura *et al.*, 2001). Nicht nur der Austausch von Histonen, sondern auch ihre Modifikationen wie die Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und die Methylierung beeinflussen die Transkription. Die geöffnete Form des Chromatins wird als Euchromatin bezeichnet, die kompaktere als Heterochromatin.

1.8 Euchromatin

Euchromatin wird durch ein hohes Maß an Histon-Acetylierung, die durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) vermittelt wird, charakterisiert. Die Acetylierung vom Lysinrest 9 des Histons 3 (H3K9) durch HATs führt zur Dekondensation des Chromatins (Chambeyron und Bickmore, 2004). Unter den Modifikationen, die ebenfalls mit einer Steigerung der Transkriptionsrate verbunden sind, zählt die Tri-Methylierung des Histons H3 am Lysin-Rest 4 (H3K4me3). Diese wird vor allem in Nukleosomen in den Promotorregionen von aktiv transkribierten Genen gefunden. Weitere Methylübertragungen, die zu einer Öffnung des Chromatins führen, sind an H3K36 und H3K79 beschrieben worden (Bernstein *et al.*, 2002).

1.9 Heterochromatin

Heterochromatin ist bei der Zellteilung verdichtet und bleibt es auch in der Interphase des Zellzyklus. Es ist weitgehend in der Kernperipherie und im Nukleolus konzentriert und nicht sehr aktiv in der Transkription. Die konstitutive Form des Heterochromatins ist in allen Zellen des Körpers etwa gleich verteilt, während fakultatives Heterochromatin variiert, was die Regionen des Genoms je nach Zelltypen betrifft (Pritchard und Korf, 2003). Eine H3K9, H3K27 und H4K20 Tri-Methylierung in den heterochromatischen Regionen des Chromatins führt zu einer geschlossenen Struktur und somit zu einer Repression der Transkription (Kouzarides T, 2007). Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt in der Charakterisierung insbesondere der H3K9 Methylierung unter der Kontrolle der Histon-Deacetylase 4 (HDAC4) sowie deren Zusammenhang mit der Re-Expression fetaler Gene.

1.10 Modifikationen der Histone

Neben der DNA als eigentlichem Informationsträger der Zelle spielen die posttranslationalen Modifikationen der basischen Aminosäuren der Histone bei der Regulation der DNA-Transkription eine essentielle Rolle. So steuern die verschiedenen Kombinationen der Histonmodifikationen, auch als Histon Code bezeichnet, den Zeitpunkt und das Ausmaß der Gen-Transkription.

1.10.1 Acetylierung der Histone

Histon-Acetyltransferasen, sogenannte HATs, übertragen Acetylgruppen von Acetyl-CoA auf die ϵ -Aminogruppen der Lysin-Reste von Histonen. Diese Acetylierungen bedingen eine Auflockerung der Chromatinstruktur und Erhöhung der transkriptionellen Aktivität. Bei dieser Modifikation handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion. Die Acetylierungen werden von Histon-Deacetylasen, HDACs, wieder entfernt, wodurch die Kondensation des Chromatins wieder zunimmt. Es gibt zwei Gruppen von HATs: Typ A, die im Kern lokalisiert sind und Typ B, die sich im Zytoplasma befinden und an der Acetylierung von *de novo* synthetisierten Histonen beteiligt sind (Sternier, 2000).

1.10.2 Histon-Deacetylasen (HDACs)

HDACs werden in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Zur Klasse I gehören HDAC 1, 2, 3, 8, der Klasse II sind HDAC 4,5,6,7,9 und 10 zugeordnet und in der Klasse III gibt es HDAC 11 (Hildmann *et al.*, 2007). Die SiR2 Klasse unterscheidet sich von den anderen HDACs, da sie NAD⁺ abhängige Reaktionen katalysiert (Vaquero *et al.*, 2007). Um diese Reaktionen durchzuführen, wird eine Domäne von 390 Aminosäuren benötigt, die hochkonserviert ist. HDACs kommen in nukleären Komplexen vor und sind Repressoren der Genexpression. Es wird angenommen, dass Klasse I HDACs in fast allen humanen Zellen exprimiert werden. Klasse II HDACs zeigen hingegen ein zellzyklus- und gewebespezifisches Auftreten (Vega *et al.*, 2004).

1.10.3 HDAC4

Die Gensequenz von HDAC4, einer Klasse II HDAC, ist auf 2q37 lokalisiert und kodiert in der Maus für ein 118.562 Da schweres Protein. HDAC4 zeigt eine 70%ige Homologie mit HDAC5. Es wurden Interaktionen von HDAC4 mit beispielsweise HDAC3, HDAC5, CtBP, MEF2 und 14-3-3 beschrieben (Zhang, 2002). Im Gegensatz zu den ubiquitär exprimierten HDACs der Klasse I wird HDAC4 vorwiegend in Skelettmuskelzellen und Kardiomyozyten exprimiert. HDAC4 ist in differenzierten Kardiomyozyten ein Repressor der Hypertrophie-assoziierten/relevanten Gene.

Eine Aktivierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren führt zum Auslösen einer Signalkaskade, die in einer Phosphorylierung von HDAC4 mündet, was wiederum ein Signal für den Export von HDAC4 aus dem Nukleus in das Zytosol darstellt. Für diese N-terminale Modifikation sind Calcium/Calmodulin-abhängige Protein-Kinasen (CaMKs) oder die Protein-Kinase D (PKD) zuständig.

Die Arbeitsgruppe von J. Backs zeigte, dass speziell die CaMKII den nukleären Export von HDAC4 in Kardiomyozyten vermittelt (Abb. 3, übernommen aus Backs *et al.*, 2006). Die CaMKII phosphoryliert HDAC4 direkt und initiiert dadurch den Export vom Nukleus ins Zytosol. Das modifizierte Protein bindet zunächst am nukleären Export Faktor CRM1, der es ins Zytosol befördert.

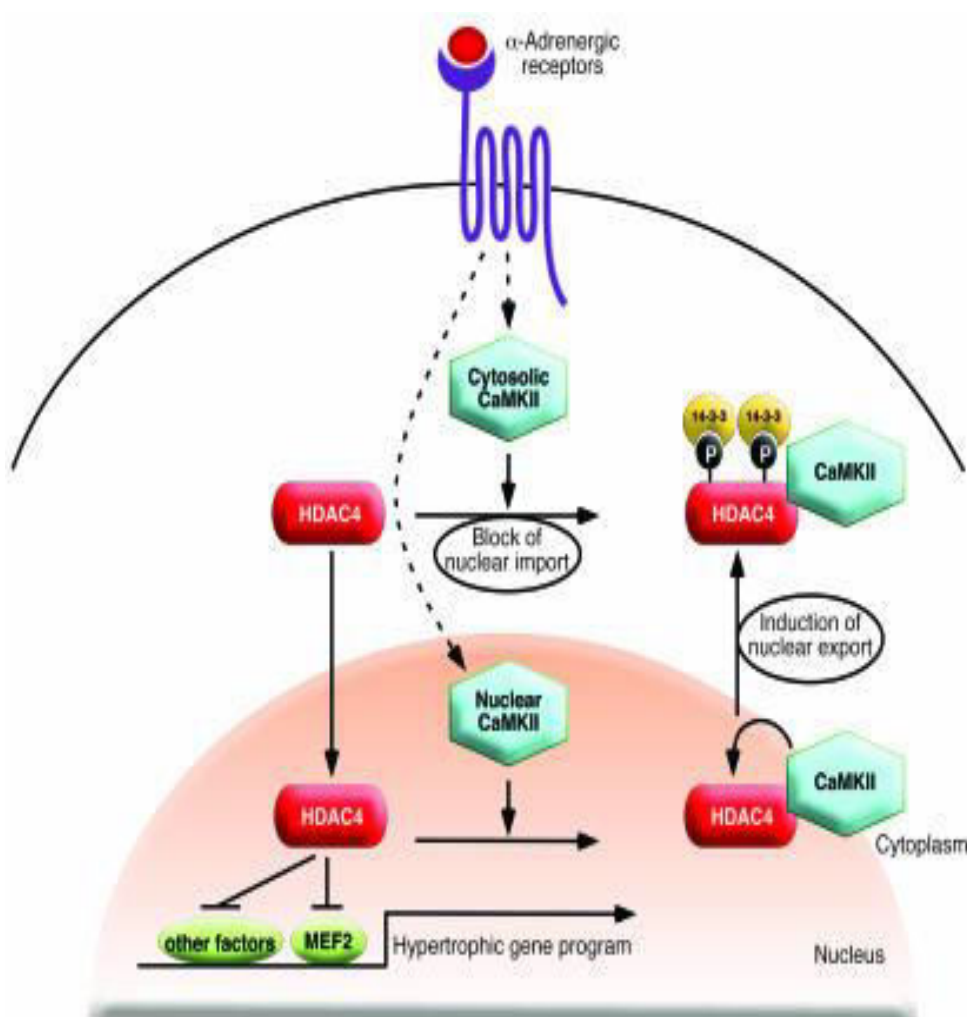


Abbildung 3 CaMKII- HDAC4- Signalkaskade

Dargestellt ist die α-adrenerge Aktivierung der CaMKII, diese phosphoryliert HDAC4 im Zellkern. Dadurch wird der HDAC4-Export ermöglicht und die Repression von MEF2 sowie anderen aktivierenden Transkriptions-Faktoren aufgehoben.

Bildquelle: Backs *et al.*, 2006

Im Zytosol angekommen, bindet HDAC4 am „Chaperon“-Protein 14-3-3, das zellzyklusabhängig unterschiedlich stark exprimiert wird. Durch Dephosphorylierung wird es wieder freigesetzt und kann zurück in den Zellkern transloziert werden. Im Zytoplasma findet sich HDAC4 vor allem in undifferenzierten Myoblasten (Backs *et al.* 2006, McKinsey 2000, 2007).

Wenn HDAC4 phosphoryliert wird, dissoziiert es vom Transkriptionsfaktor MEF2 ab. Das Binden von HDAC4 an MEF2 verhindert die Funktion von MEF2 als myozytären Transkriptionsfaktor. Wenn MEF2 von HDAC4 freigesetzt wird, kann es kooperative Wechselwirkungen mit anderen myogenen Transkriptionsfaktoren eingehen. MEF2 allein besitzt keine myogene Aktivität (Wang *et al.*, 2001). MEF2 ist unter anderem verantwortlich für die Muskeldifferenzierung, die Integrität der Sarkomere und die postnatale Reifung in der Skelettmuskulatur (Wang, 1999; Potthoff und Olson, 2007). MEF2 reguliert aber auch die Expression einer Vielzahl von Herz-Struktur- und kontraktilen Proteinen. Außerdem ist MEF2 als Regulator von anderen kardialen Kern-Promotor Transkriptionsfaktoren, die für Kardiomyozytendifferenzierung von Bedeutung sind, erforderlich (Potthoff und Olson 2007). Die Expression von MEF2C und ANP wird synergistisch aktiviert (Zang *et al.*, 2004).

1.10.4 Methylierung der Histone

Die Methylierung als Histon-Modifikation wurde 1964 von Allfrey *et al.* erstmalig beschrieben. Sie wird katalysiert von Histon-Methyltransferasen (HMTs) und findet an Lysin oder Arginin-Resten statt. Es werden verschiedene Stufen dieser Methylrestübertragungen klassifiziert, die unterschiedliche, zum Teil zellspezifische, Wirkungen auf die Genexpression haben (Abb. 4 und Tabelle 1).

Tabelle 1 Histon-Modifikationen

Lysin-Rest	Wirkung auf die Genexpression A= Aktivierung, I= Inhibierung	
Monomethylierung	H3K4 A Benevolenskaya, 2007	H3K9 A / I Barski <i>et al.</i> , 2007 Rosenfeld <i>et al.</i> , 2009
Dimethylierung	H3K4 A Bergmann <i>et al.</i> , 2011	H3K9 I Rosenfeld <i>et al.</i> , 2009
Trimethylierung	H3K4 A/I Koch <i>et al.</i> , 2007	H3K9 I Barski <i>et al.</i> , 2007

Diese Methylierungen haben je nach Grad (Mono-, Di-, Trimethylierung) und Lokalisation unterschiedliche Auswirkungen auf die Chromatinstruktur.

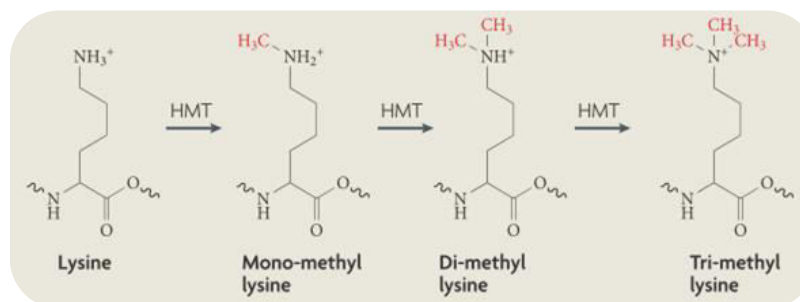


Abbildung 4 Methylierungsreaktionen

Dargestellt ist der mehrstufige Methylierungsprozess an einem Lysinrest.

Bildquelle: Zhang *et al.*, 2007

An den Arginin-Resten wird die Methylierung durch Protein-Arginin-Methyltransferase (PRMT) bewerkstelligt. Für die Lysin-Methylierung sind vorwiegend SET-Domain-haltige Proteine zuständig.

1.11 SET-Domain

Fast alle bekannten Lysin-Histon-Methyltransferasen (HKMTs) enthalten eine evolutionär konservierte SET-Domäne (Dillon *et al.*, 2005; Qian *et al.*, 2006; Couture *et al.*, 2006). Die SET-Domäne wurde zuerst in *Drosophila* in Verbindung mit drei Proteinen identifiziert: Su(var)3-9, Enhancer of zeste und Trx (Rea *et al.*, 2000). Die Enzyme SUV39H1 und G9a katalysieren die Methylgruppenübertragung an H3K9. Dabei ist eine Interaktion auch mit dem Heterochromatin-Protein 1 (HP1) beschrieben worden. Der H3K9-Methylierung kommt eine zentrale Rolle sowohl bei der Bildung von Heterochromatin, der Inaktivierung von X-Chromosomen und der DNA-Methylierung durch Dnmt3a/b zu (Kouzarides, 2007; Anup, 2011).

1.12 G9A

Die euchromatische Histon-Lysin-N-Methyltransferase 2 (EHMT2), auch G9a genannt, steuert durch die Dimethylierung von H3K9 die Genexpression. Für die humane G9a wurde unter anderem von Lee *et al.* 2006 gezeigt, dass sie in Interaktion mit Androgen-, Östrogenrezeptoren und HP1 steht. Eine der Hauptaufgaben besteht in der Repression euchromatischer Gene (Lee *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2009, Chaturvedi *et al.*, 2009). Die Lysin-Methyltransferase G9a wird dynamisch in Myoblasten exprimiert. Sie beeinträchtigt die Zelldifferenzierung durch Histon H3 Lysin-9-Dimethylierung (H3K9me2) von MyoD-Promotoren (Ling *et al.*, 2012). Über die Funktion der G9a in differenzierten Kardiomyozyten ist noch wenig bekannt.

1.13 SUV39H1

SUV39H1 wurde erstmals von Aagaard *et al.* 1999 aus humanem Gewebe isoliert. Das Protein verfügt über eine Chromodomäne und am C-terminalen Ende über eine SET-Domäne (Firestein *et al.*, 2000). SUV39H1 wandelt die Mono- oder Di-Methylierung an H3K9 in stabileres trimethyliertes H3K9 um (Lachner *et al.*, 2003). Sie trägt damit zur Bildung von Heterochromatin bei (Peters, 2001). Die Chromodomäne dient der Protein-Protein-Interaktion, zum Beispiel von SUV39H1 mit HP1 (Nielsen *et al.*, 2001). Außerdem kann SUV39H1 noch mit HDAC 1,2,3,4,5,9, HDLBP (Vigilin), RB1, SIRT1 sowie den DNA-Methyltransferasen Dnmt1 und Dnmt3a interagieren (Nielsen *et al.*, 2001; Vaute *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2008; Fuks *et al.*, 2003). Durch Interaktion mit MyoD in den Promotorregionen der Muskelgene von proliferierenden Myoblasten trägt SUV39H1 zu deren transkriptionellen Inhibition bei (Mal, 2006). Die MyoD mRNA Expression in der Herzinsuffizienz ist erniedrigt (Carvalho *et al.*, 2006 mit Verweis auf Anker *et al.*, 1999). In Skelettmuskelzellen wurde eine Interaktion von MyoD mit MEF2A nachgewiesen (Zang *et al.*, 2004). Diese Daten zeigen, dass SUV39H1 zur Methylierung von H3K9 und somit zur Repression von Genexpression beiträgt.

1.14 Histon-Demethylierung

Auch für die Methylierung gibt es einen Umkehrprozess, der durch Histon-Demethylasen (HDMs) bewerkstelligt wird. Da die Nomenklatur der Demethylasen durch viele neue Entdeckungen etwas umständlich geworden ist, soll die Tabelle einen Überblick auf die in der vorliegenden Arbeit relevanten Demethylasen geben (Allis *et al.*, 2007).

Tabelle 2 Histon-Demethylasen

Name(neue Nomenklatur)	Modifikationspunkt	Referenz
LSD1(KDM1)	H3K4me2/1 und H3K9me1/2	Shi <i>et al.</i>
JMJD1A(KDM3A)	H3K9me1/2	Loh <i>et al.</i>
JMJD2A(KDM4A)	H3K9me2/3	Whetstone <i>et al.</i>

1.15 LSD1

Man hat lange angenommen, dass die Histon-Methylierung irreversibel ist, bis 2004 das Enzym LSD1 (lysine specific demethylase 1, auch als KDM1 bezeichnet) von Shi *et al.* als erste Histon-Demethylase (HDM) beschrieben wurde. LSD1 ist eine Flavin-abhängige Amin-Oxidase, die H3K4me2/me1, H3K9me2/me1 und p53 demethyliert (Shi *et al.*, 2004; Metzger *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007). Co-Faktoren für die Demethylierung von H3K4me1/2 durch LSD1 sind FAD und O₂. Dabei entsteht Formaldehyd, und der Lysinrest des Histons 3 wird wieder für Modifikationen frei (Abb. 5).

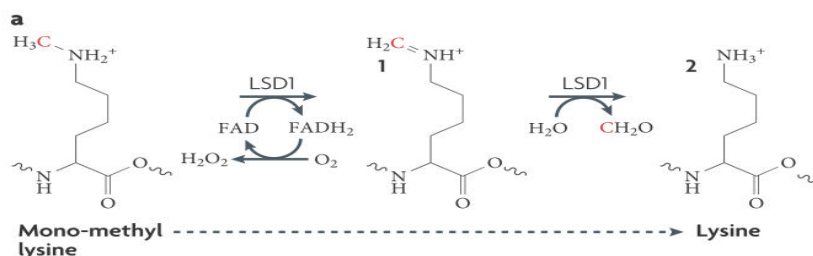


Abbildung 5 Demethylierung durch die LSD1

Durch die hier gezeigte FAD-abhängige Entfernung des Methylrestes wird der Lysinrest frei für andere Modifikationen, zum Beispiel Acetylierungen.

Bildquelle: Zhang *et al.*, 2007

LSD1 ist in verschiedenen Histonmodifikations-Komplexen zu finden, zum Beispiel mit REST (RE1-silencing Transkriptionsfaktor) und dem Korepressor CoREST, die es der LSD1 ermöglichen, Nukleosomen zu demethylieren (Shi *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005).

1.16 Jumonji Domänen – Proteine

Die sog. „Jumonji Domain containing“-Demethylasen (JMJD) spielen verschiedene funktionale Rollen in vielen biologischen Prozessen einschließlich DNA-/RNA-Reparatur, Hydroxylierung von Protein- und Lipid-Seitenketten und der Histon-Demethylierung von mono-, di- oder trimethylierten Lysin-Resten. Sie benötigen für ihre Funktion Fe^{2+} und α -Ketoglutarat und besitzen ein breites Spektrum an Substraten, wie zum Beispiel H3K4, H3K9 und H3K36 (Falnes *et al.*, 2002; Trewick *et al.*, 2002; Dann *et al.*, 2005). Derzeit sind ca. 30 Jumonji-haltige Proteine des menschlichen Proteoms bekannt. Von diesen sind 20 in der Lage, Histon-Demethylierung durchzuführen. Basierend auf den Verwandtschaftsbeziehungen und Domain-Architekturen werden diese Proteine in sieben Unterfamilien aufgeteilt (Klose *et al.*, 2006, 2007). Für einige dieser Gruppenmitglieder wurden auch Hormon-Rezeptorinteraktionen beschrieben. So wirken Thyroidhormone auf die JMJD2C und Testosteron auf die JMJD2A. Die JMJD2A soll laut Gray *et al.* auch mit HDACs wechselwirken (Gray *et al.*, 2005).

1.17 JMJD2A

Die JMJD2A gehört zur JMJD2/KDM4-Unterfamilie, zu der auch die JMJD2B, C und D gehören. Das Protein besteht aus 1064 Aminosäuren, es lässt sich in sechs Domänen unterteilen: zwei „plant homodomains“ (PHD), zwei Tudor-Domänen, sowie einer Jumonji C (JmjC) und einer Jumonji N (JMjN)-Domäne (Ulucan *et al.*, 2011). Über ihre Tudor-Domäne bindet die JMJD2A an verschiedene Histon-Sequenzen, wie H3K4me3 und H4K20me3 (Huang *et al.*, 2006). Die katalytische Kern-Domäne des JMJD2A-Enzyms besteht aus den ersten 350 Aminosäuren, den JMjN- und JmjC-Domänen. Die JmjC-Domäne ist dabei für einen Demethylierungs-Mechanismus notwendig, der von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist (Chen *et al.*, 2006, Trewick *et al.*, 2006).

Diese JmjC Domäne der JMJD2A ist in der Lage, tri- und di-methylierte H3K9 (H3K9me3 / 2) und H3K36 (H3K36me3 / 2) zu demethylieren, di-methyliertes H3K9 allerdings mit einer sehr niedrigen Umsatzrate (Couture, 2007). Die Demethylierung durch eine Hydroxylierung erfordert Fe^{2+} sowie α -Ketoglutarat und erzeugt Formaldehyd und Succinat. Mitglieder der JMJD2-Unterfamilie fungieren als Trimethylierungs-spezifische Demethylasen und dienen der Feinabstimmung der Histon-Methylierung (Whetstone *et al.*, 2006). Außerdem ist die JMJD2A an der Muskel-Differenzierung über Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren MyoD und MEF2 beteiligt (Verrier *et al.*, 2011). Die JMJD2A fördert die Entstehung der kardialen Hypertrophie unter pathologischen Bedingungen. Dies wurde zeitgleich zur vorliegenden Arbeit von Zhang *et al.* 2011 in TAC-operierten Mäusen nach 3 Wochen Beobachtungszeit nachgewiesen. Unter diesen Bedingungen wurde auch eine vermehrte Bindung der JMJD2A in der Promotorregion prohypertropher Gene wie Four and a Half LIM (FHL) festgestellt. Bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie konnte eine erhöhte Genexpression der JMJD2A registriert werden. JMJD2-defiziente Mäuse wiesen ein

vermindertes kardiales Remodeling auf (Zhang QJ *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wird ebenfalls untersucht, inwiefern die Regulation von JMJD1 und JMJD2 zu einer differenziellen H3K9 Methylierung bei Herzinsuffizienz beitragen könnte.

1.18 JMJD1A

JMJD1A demethyliert spezifisch H3K9me2/me1. Eine erhöhte Expression der JMJD1A ist im Testes nachgewiesen, dort ist sie an der Demethylierung von H3K9me2 bei Androgen-Rezeptor-Target-Genen beteiligt. Die JMJD1A dient der Entfernung der repressiven H3K9-Markierungen während der Spermatogenese bei Mäusen. Sie ist an der Kondensation des Chromatins in Spermien entscheidend beteiligt (Agger *et al.*, 2008). Die JMJD1A wird auch in Stammzellen exprimiert, eine Depletion führt dort zur Zell-Differenzierung. Auch die Expression Stammzell-spezifischer Gene geht nach *Jmjd1a* knock-down zurück (Loh *et al.*, 2007). Die JMJD1A könnte daher im Zusammenhang mit der Reaktivierung des fetalen Genprogramms stehen.

Die Muster der Histon-Modifikationen sind elementar für epigenetische Regulation der Genexpression. Sie können verwendet werden um aktivierte beziehungsweise reprimierte Chromatindomänen und Chromatinveränderungen im Genom zu unterscheiden. Das Kennzeichen aktiver Gene in heterochromatischen Domänen scheint ein Verlust von H3K9 Methylierung an der Transkriptionsstartstelle zu sein (Riddle *et al.*, 2011). Es gibt Hinweise auf eine "epigenetische Balance" zwischen euchromatischen und heterochromatischen Chromatinkomponenten und damit einem Gleichgewicht zwischen Genrepression und Aktivierung (Riddle *et al.*, 2011).

1.19 H3K9me3 Bindung durch HP1

Das Heterochromatin beinhaltet eine komplexe Anordnung von Histon-Modifikationen, die gekennzeichnet sind durch Hypoacetylierung und Trimethylierung von H3K9 (Fischer *et al.*, 2009). HP1alpha ist ein Protein aus der Heterochromatin Protein Familie. 1986 wurde es erstmals von James und Elgin nachgewiesen. Es ist in der Lage, über eine N-terminale Chromo-Domäne an die Lysinreste von Histonen zu binden (Bannister *et al.*, 2001). Die Chromo-Domäne wurde erstmals in Proteinen der *Drosophila melanogaster* beschrieben, genauer dem heterochromatin protein 1 und Polycomb (Pc). Die Anwesenheit dieser Proteine führt zur Kondensation des Chromatins und zu einer verminderten Genexpression (Gray *et al.*, 2007; Zhang und Reinberg, 2006). Die C-terminale Domäne, auch chromo-shadow-domain (CSD) genannt, dient der Homodimerisierung und Interaktion mit anderen Kern-Proteinen, wie zum Beispiel HDAC 4, 5, 9, SUV39H1 (Brasher *et al.*, 2000; Sadaie *et al.*, 2008). Die Länge dieser Protein-Domäne beträgt 40-70 Aminosäuren. Durch die HP1-Bindung an die Trimethylgruppen von H3K9 wird der Zugang von Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel MEF2, an die DNA behindert (Lachner *et al.*, 2001; Abb. 6). HP1 bindet dabei unabhängig von dem Enzym, das die Modifikation herbeiführte an H3K9me3 (Greil *et al.*, 2003).

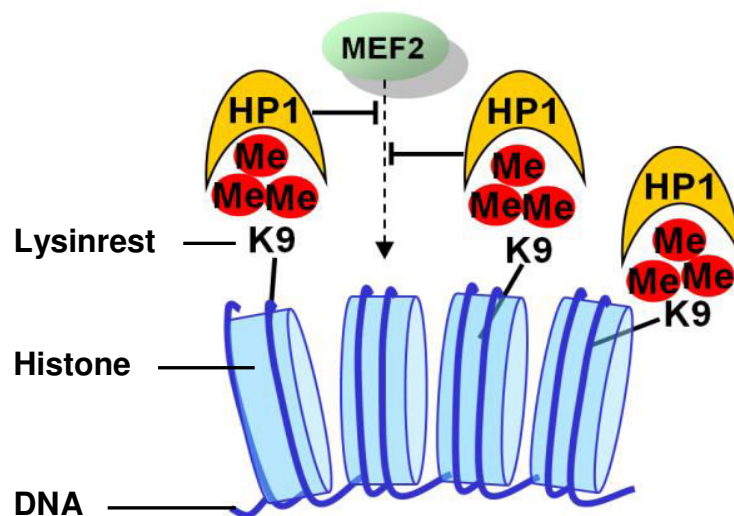


Abbildung 6 Chromatinkondensation durch HP1

MEF2 wird durch HP1 an der Promotor-Bindung gehindert (nach Lachner *et al.*, 2001)

1.20 Zusammenspiel von Acetylierung und Methylierung

Die Klasse II Histondeacetylasen (HDACs) 4, 5, 7 und 9 unterdrücken die Muskel-Differenzierung und Reaktivierung des fetalen Genprogramms in proliferierenden Myoblasten. Dies geschieht durch Ausbildung einer lokal repressiven Chromatinstruktur, die durch Assoziationen mit dem Transkriptionsfaktor MyoD gekennzeichnet ist (Yahi *et al.*, 2008, siehe Abb. 3 und 7A). HDAC4 und -5 sind mit HP1 assoziiert. Durch die Aktivierung der CaMKII-Signalkaskade werden diese Interaktionen gestört. Die Methylierung von Lysin-Rest 9 des Histons H3, die unter anderem von der Histon-Methyltransferase SUV39H1 durchgeführt wird, mündet in einer Repression der Transkription durch die Schaffung von Bindungsstellen für die Chromodomäne (CD) des Heterochromatin Proteins 1 (Stewart *et al.*, 2005). Ein Komplex aus HDACs mit HP1 und SUV39H1 wurde von Zhang *et al.* 2002 im Zellkultursystem in COS-Zellen beschrieben. Dieser Verband könnte ein möglicher Kopplungsmechanismus der Histon-Deacetylierung und Methylierung sein (Abb. 7B).

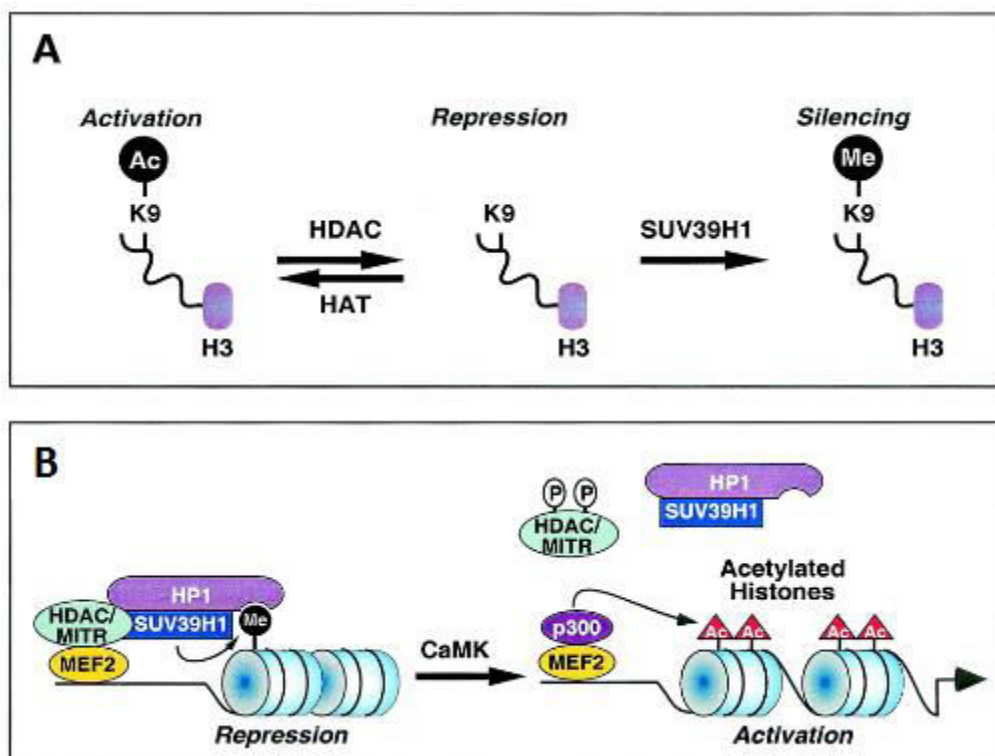


Abbildung 7 Zusammenspiel von Acetylierung und Methylierung

(A) Modifikation an H3K9 und ihre Wirkung auf die Genexpression

(B) Im Zellkultursystem dissoziiert HDAC4 nach CaMK-Aktivierung vom HP1-SUV39H1-Komplex

Bildquelle: Zhang *et al.*, 2002

2.0 Ziele der Arbeit

Die zellulären und molekularen Mechanismen, die dem kardialen Remodeling bei der Entstehung der Herzinsuffizienz zu Grunde liegen, sind noch nicht gänzlich verstanden. Die Reaktivierung fetaler Gene beinhaltet natriuretische Peptide wie ANP und BNP, die zur Diagnose und Verlaufskontrolle der Herzinsuffizienz verwendet werden, die aber als Gegenspieler des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems eher protektive als maladaptive Effekte für das insuffiziente Myokard haben. In ähnlicher Weise wie die natriuretischen Peptide werden aber auch eine Reihe anderer Gene reguliert, die Veränderungen der Myofilamente und Ionenhomöostase bewirken und eher ungünstige Effekte auf die myokardiale Funktion haben. Die meisten fetalen Gene werden durch den Transkriptionsfaktor MEF2 und von upstream durch die Histon-Deacetylase 4 reguliert. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Re-Expression dieser fetalen Gene am Beispiel des ANP Gens hinsichtlich epigenetischer Modifikationen und die Kontrolle durch HDAC4 näher zu untersuchen. Hierbei stehen insbesondere die Methylierung von H3K9 und H3K4 an der Promotorregion der natriuretischen Peptide ANP und BNP im Zentrum, sowie das Binden von Heterochromatin Protein 1 (HP1) an die Promotorregionen. Dies geht auf die Beobachtung aus Vorexperimenten unserer Gruppe zurück, dass sich die Histon-Acetylierung in den Promoter Regionen von ANP und BNP nur in geringem Umfang änderte.

In der vorliegenden Arbeit wird daher die Hypothese getestet,

1. dass es bei chronischer Herzinsuffizienz zu einer Veränderung der Histon-Methylierung, insbesondere von H3K9, sowie einem veränderten Binden von HP1 an die Promoterregion kommt, was eine Beeinflussung der Chromatinstruktur hinsichtlich der Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren bedingt;
2. dass eine Erhöhung der kardialen Vor- und Nachlast im isolierten Mäuseherzen eine dynamische Regulation der Histon-Methylierung in der Promoterregion des ANP Gens verursacht, und
3. dass die H3K9 Methylierung durch HDAC4 reguliert wird.
4. Darüber hinaus wird die Rolle verschiedener Histon Methyltransferasen und -Demethylasen bei chronischer Herzinsuffizienz getestet.

3.0 Methoden

Humanes Spendermyokard

Die Tabelle zeigt die klinischen Parameter und Medikation der Spender des linksventrikulären Myokards mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM, n=8) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM, n=8) sowie einige Parameter von 8 Spenderherzen ohne Anzeichen einer Herzerkrankung, die nicht zur Transplantation wegen eines ABO-Mismatch verwendet werden konnten.

Tabelle 3 Spender- Myokard

	NF	ICM	DCM
Anzahl der Patienten	8	8	8
Geschlecht			
weiblich	3	-	4
männlich	5	8	4
Alter in Jahren	32-69	52-60	27-64
Medikation			
ACE-I/ AT ₁ - Antagonisten		100%	50%
â-Blocker		75%	50%
Aldosteron-Antagonisten		50%	75%
Digitalis		100%	15%
Diuretika		75,00%	100%
Inotropika		0%	100%
Nitrate		50%	0%
Statine		75%	0%

Mäuse

Die CD-1 Mäuse wurden von Charles River Laboratories International, Inc. bezogen.

HDAC4-KO

Die Versuchstiere wurden im Rahmen einer Kooperation von Johannes Backs, Uni Heidelberg zur Verfügung gestellt. Um HDAC4 mit Hilfe eines Rekombinase-Systems, zum Beispiel dem Cre/loxP-System, kardiomyozytenspezifisch auszuschalten, wurde zunächst eine codierende Region des HDAC4 Locus, der genomischen DNA, einer C57BL/6N Maus durch Polymerase amplifiziert. Durch Gen-Targeting wurden dann 2 loxP- und FRT-Elemente in das Zielgen (HDAC4) eingebracht. Sie dienen als „Schnittstellen“ für die Rekombinase.

Für den Austausch genetischer Kassetten können mehrere Rekombinasen verwendet werden, zum Beispiel die FLP-Rekombinase (*Flippase*) oder die Cre (*cyclization recombinase*). Ein 4,2 kb großes DNA-Fragment des Introns 5 wurde subkloniert in eine FRT-flankierte Region neben der Neomycin-Resistenz-Kassette als Ziel für die FLP-Rekombinase. Der 1,0kb große Knockout-Bereich, der das codierende Exon 6 beinhaltet, wurde zwischen den loxP-Stellen eingefügt. Diese Resistenz-Kassette ist nötig, um die Neomycin resistenten Zellen zu selektieren. Mäuse, bei denen 2 loxP-Elemente ein essentielles Exon flankieren, werden auch als „gefloxt“ Maus bezeichnet. Ohne Cre oder FLP-Rekombinase Expression sollte dieses gefloxt Gen intakt bleiben und normal exprimiert werden.

Der HDAC4 Ziel-Vektor wurde linearisiert und durch Elektroporation in embryonale Stammzellen eingebracht. Ein Klon wurde in einen C57BL/6N-Blastozysten injiziert und in den Uterus eines pseudoschwangeren Weibchens übertragen. Die chimären männlichen Mäuse ($HDAC4_{neo-loxP/+}$) wurden in einer C57BL/6N-Linie weiter gezüchtet. Heterozygote $HDAC4_{neo-loxP/-}$ -Mäuse wurden zur Entfernung der Neomycin-Resistenz-Kassette mit FLP transgenen Mäusen gekreuzt (Abb. 8).

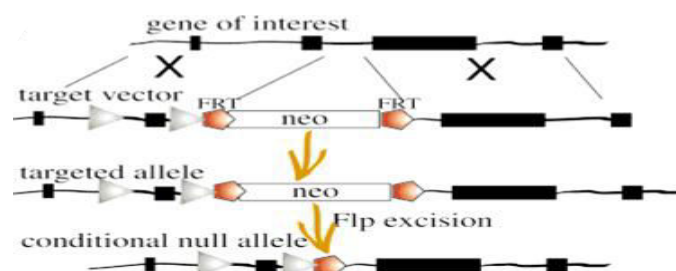


Abbildung 8 Der konditionale Gen-Knock-Out (KO)

Cre-Exzision eines konditionalen Knockout-Allels durch die Kombination des Cre / loxP mit dem FLP/FRT-System. Nach Nagy, 2000

Das Fehlen der Neomycin-Resistenz-Kassette in den $HDAC4_{loxP/+}$ -Mäusen wurde durch Southern-Blot-Analysen und PCR bestätigt. Bringt man regulatorische Elemente vor die Rekombinase, kann deren Expression kontrolliert werden. Cre transgene Mäusen wurden mit $HDAC4_{loxP/+}$ -Mäusen gekreuzt. Die heterozygoten Mäuse wurden zur Homozygotie gezüchtet, um Mäuse mit einem HDAC4-Null-Allel zu erhalten.

Es wurde der identische Phänotyp wie in Knockout-Mäusen mit globalem HDAC4-Knockout festgestellt. Um Mäuse mit einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion von HDAC4 zu erhalten, wurde das Cre-Rekombinase System verwendet. Durch die Verwendung eines zellspezifischen Ziel-Vektors, zum Beispiel α -MHC, kann die Induktion von Cre gezielt in Kardiomyozyten erfolgen. HDAC4^{loxP/loxP}-Mäuse wurden mit HDAC4^{loxP/loxP}; α -MHC-Cre Mäusen gekreuzt, um den Knock-out in den postmitotischen Kardiomyozyten zu erreichen (Abb. 9).

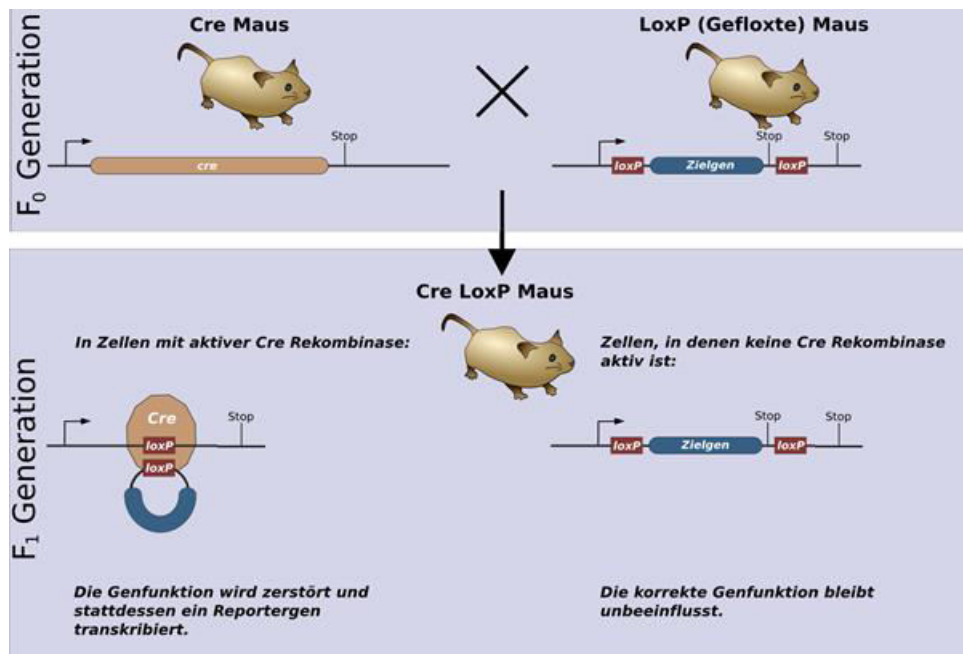


Abbildung 9 Funktion eines Cre/loxP-Systems

Das Kreuzen einer Cre- und LoxP-Maus führt in der F₁-Generation bei CreLoxP-Mäusen zum Knock-out des geflochten Gens. Modifiziert nach Matthias Zepper, wikipedia.org

Der gewebespezifische HDAC4 Knock-out im Myokard wurde mittels Western-Blots verifiziert. In den Wurfgeschwistertieren war HDAC4 weiterhin exprimiert (Abb. 10). Der geringe Rest der HDAC4 Expression im Herzen ist auf die Expression von HDAC4 in Nicht-Kardiomyozyten zurückzuführen, die von dem Kardiomyozyten-spezifischen KO nicht betroffen sind.

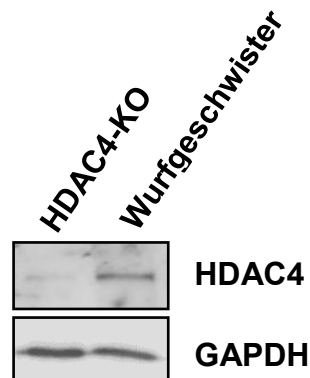


Abbildung 10 HDAC4 –KO im Myokard der Versuchstiere

Beispielbild eines Western-Blots zur Bestätigung des HDAC4 Knock-out

3.1 Chromatin Immunopräzipitation

Linksventrikuläres Myokard wird unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerrieben. Das Pulver wird anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml eiskaltem 1xPBS und 27,2 µl Formaldehyd (37%, Sigma) versetzt und auf einem Rotator (VWR) für 20 min bei RT inkubiert. Formaldehyd dient dem „cross-linking“, einer reversiblen Verbindung der DNA mit den Histonen. Das „cross-linking“ wird durch Zugabe von 250 µl kaltem 1M Glycerin gestoppt und erneut auf dem Rotator bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Anschließend wird zweimal mit 9000 rpm für 2 min zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 1 ml eiskaltem 1xPBS gewaschen. Danach wird das Pellet mit 1 ml Chip-Sonification-Puffer (dient der Lyse der Zellen) und 50 µl Protease-Inhibitor versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wird das in der Suspension enthaltene Chromatin mittels Ultraschall (Branson Sonifier) fragmentiert. Dazu wird die Suspension 10 Mal für 30 s (Einstellungen: 30% Duty cycle und Output 3) den Ultraschallpulsen ausgesetzt. Das Ziel ist es, eine ideale Fragmentlänge von ca. 600 bp zu erreichen. Anschließend werden die Zellfragmente in einer Kühlzentrifuge bei 4°C für 10 min und 13000 rpm gefällt. 200 µl des Überstandes werden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml Chip-Sonification-Puffer aufgefüllt, der Rest des Überstandes wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für weitere Versuche aufbewahrt. Den Proben werden 40 µl Protein-A/G-Agarose-Beads (Calbiochem) zugegeben und bei 4°C für 2 h vorgereinigt – was als „preclearing“ bezeichnet wird. Das „preclearing“ soll Proteine, die unspezifisch an die Beads binden, ausfällen. Danach wird die Probe für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. 200 µl werden direkt als Inputkontrolle zurückgehalten, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Der restliche Überstand wird in je 200 µl Aliquots aufgeteilt und der spezifische Antikörper (siehe Kap. 4.2) gegen das gesuchte Histon/Protein im Überschuss zugegeben. Als Negativ-Kontrolle, die sogenannte „no Antibody control = noAB“, werden unspezifisch bindende Maus-IgGs zugegeben. Danach folgen 12 h Inkubationszeit. Die Proben werden mit 30 µl Protein A/G-Agarose Beads versetzt und bei 4°C für weitere 3 h auf dem Rotator inkubiert. In dieser Zeit binden die Antikörper an die Beads. Es folgt die Reinigung der Immunopräzipitate. Dazu wird 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand danach vorsichtig abgezogen. Das Agarose-Pellet wird mit 1 ml „low-salt“-Puffer versetzt und 5 min bei 4°C resuspendiert, anschließend wird 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand wieder entfernt. Dieser Schritt wird 3 Mal wiederholt. Darauf folgen ein Waschschriff mit 1 ml high-salt-wash-buffer, mit anschließender Resuspendierung, wie oben beschrieben und die Zentrifugation für 5 min bei 3000 rpm. Selbiges wird einmalig mit 1 ml Li²⁺-Puffer und danach 2 Mal mit 1 ml TE-Puffer durchgeführt.

Nach der letzten Zentrifugation wird der TE-Puffer über dem Pellet entfernt und die restliche Flüssigkeit aus dem Pellet mit einer Spritze abgezogen. Auf das Pellet werden 250 µl frisch angesetzter Elutionpuffer gegeben, um die Immunkomplexe wieder von den Beads zu trennen.

Dies geschieht auf dem Überkopf-Rotator bei Raumtemperatur für 30 min. Im Folgenden zentrifugiert man wieder für 5 min bei 3000 rpm und bringt den Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß. Die Beads werden nochmals mit 250 µl Elutionpuffer versetzt, um die verbleibenden gebundenen Komplexe zu lösen. Nun wird wiederholt zentrifugiert und dieser Überstand zu dem bereits abgenommenen gegeben.

Es folgt ein RNA-Abbau. Dazu gibt man zu allen Proben, auch den Input-Kontrollen, 1 µl RNase und 20 µl 5M NaCl und inkubiert den Ansatz für 5 h bei 65°C auf einem Heizblock. Abschließend werden die Proben unter Zugabe von 1 ml Ethanol bei -80°C über Nacht gefällt. Es wird unter Kühlung bei 4°C 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Alkohol entfernt und das trockene Pellet in 100 µl H₂O gelöst. Um anschließend die Freisetzung der Nukleinsäuren von den Histonen zu erreichen, müssen die Proteine durch die Endo- und Exopeptidase Proteinase K gespalten werden. Dazu werden 10 µl 0,5 M EDTA, 20 µl 1M Tris (pH 6,5) und 2 µl Proteinase K (Invitrogen) dazu pipettiert und inkubiert die Ansätze für 1 h bei 65°C auf den Heizblock.

Die jetzt ungebunden vorliegenden DNA-Stränge werden mit DNA-Purification-Kit von Qiagen wie folgt aufgereinigt. Die Proben werden mit 500 µl PB-Puffer versetzt und der pH- Wert wenn nötig mit 10 µl 3M NaAc (pH 5,5) eingestellt. Nun können die Proben in die Säule überführt werden, um dann mit 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert zu werden. Dabei erfolgt eine Adhäsion in der Säule. Der Puffer wird aus dem Reservoir entfernt und 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben. Dieser entfernt zum Beispiel störende Salze, er wird mit 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Der Puffer aus dem Reservoir wird verworfen und man zentrifugiert nochmals. Die jetzt trockene Säule wird in ein neues Eppendorfgefäß gestellt, es werden 50 µl H₂O darauf gegeben und wieder mit 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Das wiederholt man noch einmal mit weiteren 50 µl H₂O. Die so gewonnene DNA kann nun für weitere Versuche bei -20°C gelagert werden.

3.2 PCR - Polymerase Chain Reaktion

Die PCR wurde von Saiki *et al.* 1988 beschrieben und hat sich seither als eines der meist genutzten gentechnischen Verfahren etabliert. Dank ihr ist es möglich, Nukleotidsequenzen in vitro zu vervielfältigen und nutzbar zu machen. Der Ablauf ähnelt stark dem Prozess der Replikation, der in vivo stattfindet, Anfangspunkt ist auch hier das 3'-Ende der DNA. Zu Beginn der PCR hybridisieren Primer an die als Einzelstrang vorliegende DNA („Template DNA“). Das ist nur möglich, wenn der DNA-Doppelstrang vorher bei einer Temperatur von ca. 95°C zu Einzelsträngen denaturiert wird. Bei ca. 60°C lagern sich die Primer optimal an den Einzelstrang an, was als „Annealing“ bezeichnet wird. An dieses DNA-Primer-Hybrid bindet die DNA-Polymerase. Man nutzt heute die stabile DNA-Polymerase des *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) für die Durchführung mehrerer Replikationszyklen ohne Unterbrechung. Das Enzym hat sein Temperaturoptimum bei 75°C. Synthetisiert wird von 3' in 5' Richtung. So ist es möglich, selektiv die Sequenz zwischen den Primern zu vervielfältigen. Die Synthese erfolgt unter Verbrauch von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) unter Abspaltung von einem Diphosphat. Die fortlaufende Polymerisation am Einzelstrang unter Bildung des komplementären Stranges wird als Elongation bezeichnet. Es entstehen zwei neue DNA-Doppelstränge. Durch eine mehrfache Wiederholung dieser Reaktionen in einem Thermocycler steigt die Menge der Kopien der DNA-Sequenz zwischen den Primersequenzen exponentiell an. Das Thermocyclerprogramm lautet wie folgt:

Tabelle 4 Thermocyclerprogramm

Bezeichnung	Temperatur in °C	Zeit
Initiale Denaturierung	95	5 min
Denaturierung	95	45 sec
Primer-Hybridisierung	Tm-5	45 sec
Polymerisation	72	45 sec
Storage	8	unendlich

Um eine adäquate Menge an DNA zu erhalten wurden diese Schritte für die GAPDH-Promotorregion 28 Mal, für die ANP-Promotorregionen und BNP-Promotorregionen 34 Mal und für die HP1-Bindung 40 Mal wiederholt.

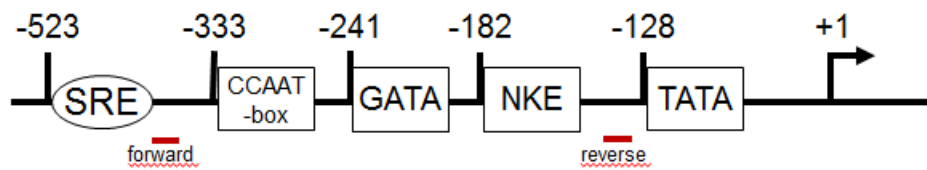
Tabelle 5 PCR-Protokoll für einen Ansatz

Substanz	Menge in µl
H ₂ O	11,25
Primer Forward	2
Primer Reverse	2
Polymerisations Puffer (mit Mg ²⁺)	2
dNTP	0,5
TaqPol [2.5 U/µl]	0,25
Template DNA (Input)	2
Volumen Total	20

Tabelle 6 Primer für die forward und reverse Lesrichtung nach ChIP für GAPDH, ANP und BNP

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur in °C
GAPDH- forward	CCC AAA GTC CTC CTG TTT CA	57,3
GAPDH- reverse	GTC TTG AGG CCT GAG CTA CG	61,4
ANP- forward	GAC AGC TGA GCC ACA AAC AA	57,3
ANP- reverse	AGT GAG AAG CCA GCA GGA GA	59,4
BNP- forward	TTC CAG CGA AAT CTG CTC TT	55,3
BNP- reverse	TCT TCA ACG GGA TTT TCA GG	55,3

human ANP promoter



human BNP promoter

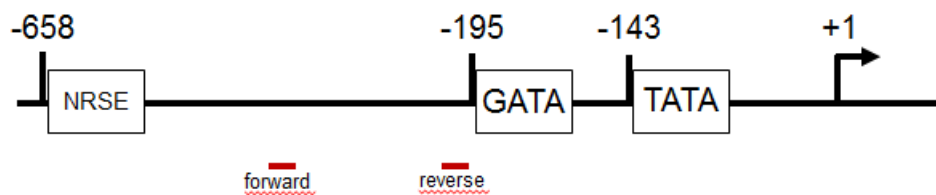


Abbildung 11 Primer Bindung am ANP und BNP Promotor in humanem Myokard

Das neuron-restrictive silencer element (NRSE) wurde upstream mehrerer neuronaler Gene identifiziert und verleiht Neuron-Spezifität durch Inhibition der Transkription in nichtneuronalen Zellen. Das serum response element (SRE) reguliert die Aktivität vieler Gene und nimmt dadurch an der Regulation des Zellzyklus, Apoptose, Zellwachstum und der Zelldifferenzierung teil

Nkx-2.5 response element (NKE): steuert in Zusammenarbeit mit anderen regulatorischen Elementen den ANP-Promotor

Tabelle 7 Primer Maus

Primer	Sequenz	Annealing-Temperatur in °C
GAPDH- forward	ACC GCC GTT ATG AAA TCT TG	55,3
GAPDH- reverse	TAT GCC CGA GGA CAA TAA GG	57,3
ANP- forward	ATC GCT TTA TCG CTG CAA GT	55,3
ANP- reverse	TCT CTG CCC ACT CTC TGG TT	59,4

mouse ANP promoter

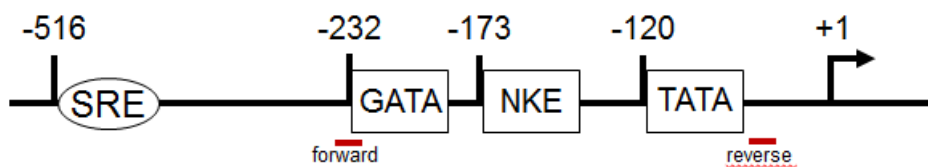


Abbildung 12 Primer Bindung am ANP Promotor in murinen Kardiomyozyten

serum response element (SRE): reguliert die Aktivität vieler Gene und nimmt dadurch an der Regulation des Zellzyklus, Apoptose, Zellwachstum und der Zelldifferenzierung teil

Nkx-2.5 response element (NKE): steuert mit anderen Elementen den ANP-Promotor

TATA (TATA-Box): Adenin und Thymin reiche Region, die als Bindungspunkt für Genregulatorproteine dient.

3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist neben der Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine der am meisten gebräuchlichen Methoden für das Auftrennen von Nukleotidsequenzen. Bei dieser Standardmethode macht man sich die unterschiedlichen Wanderungseigenschaften der negativ geladenen DNA-Fragmente zur Kathode entlang eines elektrischen Gradienten zu nutze. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist proportional zur Spannung im Elektrophoresebad, wird aber noch durch andere Faktoren bestimmt, wie durch die Fragmentlänge, die Agarose-Konzentration des Gels und den pH-Wert. Es können, abhängig von der Agarosekonzentration, Sequenzen von 0,1-60 kb aufgetrennt werden. Die Nukleinsäuren werden mittels der interkalierenden Substanz, Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Wird Ethidiumbromid mit UV-Licht (bei 254, 302 oder 366 nm Wellenlänge) angeregt, emittiert es Licht mit einem Spektrum von 500-590 nm. Die markierten DNA-Fragmente werden als rote Bande im Gel sichtbar.

Agarose-Gelelektrophorese Protokoll:

Zur Herstellung des Gels löst man 1,5 g Agarose in 120 ml 1x TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle, bis die Lösung homogen ist. Nach dem Abkühlen auf ca. 40°C wird dem Gel unter dem Abzug 2 µl Ethidiumbromid zugegeben. Das warme Gel wird in die Gelkammer gegossen und die Kämme eingesetzt, diese werden wieder gezogen, wenn das Gel fest geworden ist. Das Gel wird in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und beladen. Die Beladung erfolgt in die gespülten Aussparungen, als Größenkontrolle wurde ein 1 kb Ladder verwendet. Die Ergebnisse der Elektrophorese wurden fotodokumentiert. Mit dem Programm „Labworks“ wurde die jeweilige Leuchtdichte der Bande des gesuchten Proteins, des Input und der negativ Kontrolle unter UV-Licht quantifiziert. Die Daten wurden in eine Tabelle übertragen, dann wurde das Verhältnis der jeweiligen Antikörperfraktion zum Input gebildet. Diese Verhältnisse wurden wie im Statistikteil beschrieben ausgewertet.

3.4 RNA Isolation und Bestimmung für RT-PCR

Ziel ist es, möglichst verlustfrei RNA zu gewinnen, ohne dass RNAsen die Konzentration verfälschen. Die Isolation wurde nach dem Protokoll der Firma Peqlab durchgeführt. Gewebe des linken Ventrikels wird in einem Mörser unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zerkleinert. Das Gewebe-Pulver wird dann mit 1 ml peqGoldTrifast versetzt, mit dem Vortexer durchmischt und für 5 min bei RT inkubiert. Dieser Schritt lysiert die Zellen. Es folgt die Zugabe von 200 µl Chloroform unter dem Abzug, so wie erneutes Vortexen. Nach einer Inkubationszeit von 8 min folgte eine Zentrifugation von 5 min bei einer Temperatur von 4°C mit 13000 rpm. Dadurch wird eine Phasentrennung erreicht. In der oberen, wässrigen Phase findet sich die gesuchte RNA. Man bringt diese in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß.

Um die gelöste RNA zu konzentrieren, werden 500 µl 100% Isopropanol zugegeben und die Proben bei -80°C über Nacht gefällt. Es bildet sich nach Zentrifugation bei 4°C und 12000 rpm für 10 min ein Pellet. Dieses wird mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen um störende Salze zu entfernen. Es wird erneut unter den genannten Bedingungen zentrifugiert und das Pellet bei Raumtemperatur für 5 min getrocknet. Vor Weiterverwendung der RNA wird diese mit 50 µl 0,1% DEPC-H₂O für 5 min bei 60°C inkubiert.

Chromosomale DNA-Kontaminationen in dem RNA-Isolat können die Reverse-Transkription behindern und somit in der anschließenden PCR zu falschen Ergebnissen führen. Um die RNA von DNA zu reinigen, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde zu 10 µl Gesamt-RNA mit 0,5 µl RNase Inhibitor, 5,5 µl DMSO-Aqua dest, 2 µl 10 x DNase-I-Puffer, 2 µl DNase I versetzt, für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die DNase bei 75°C für 5 min degradiert. Danach wurden die Proben auf Eis gekühlt.

Die Menge der aufgereinigten RNA kann mit UV-Spektroskopie bestimmt werden. Das pH-Optimum für die UV-Spektroskopie-Messung liegt bei 7,5, niedrigere Werte führen zu falsch hohen RNA-Konzentrationen. Die UV-Spektroskopie der RNA wird durch unterschiedliche Absorptionsmaxima möglich. Nukleinsäuren absorbieren bei einer Wellenlänge von 260 nm, Proteinbindungen dagegen bei 280 nm. 40 µg/ml RNA-Gehalt liefern eine Extinktion von 1. Diese Eigenschaft kann dazu genutzt werden, um das E_{260}/E_{280T} -Verhältnis zu bestimmen. Bei dem angestrebten pH sollte der Quotient zwischen 1,7 und 2 liegen. Falls in reinem H₂O gemessen wird, kann sich das Verhältnis bis auf 1,5 wegen des niedrigeren pH-Wertes (5,5) verschieben. Man sollte bedenken, dass diese pH-Werte auch temperaturabhängig schwanken. Bei Werten unter 1,7 E_{260}/E_{280} ist eine Phenol/CHCl₃-Extraktion zu empfehlen. Die RNA-Messung erfolgte in einer Verdünnung von 1:50 mit H₂O.

3.5 RT-PCR – Reverse Transkription

Zur Herstellung komplementärer DNA (cDNA) aus RNA wird die Reverse-Transkription verwendet. Die Reverse Transkriptase ist ein Enzym mit unterschiedlichen Eigenschaften, es besitzt eine RNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität. Sie synthetisiert am RNA-Strang den komplementären DNA-Strang und ist eine RNA-DNA-Hybrid-abhängige RNase (RNase H), diese befreit den DNA-Strang wieder von der RNA und macht ihn zugänglich für den nächsten Syntheseschritt. Die DNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität der Reversen Transkriptase macht aus dem nun vorliegenden Einzelstrang einen DNA-Doppelstrang. Bei diesem Vorgang wird aus einem RNA-Strang ein Strang cDNA.

Tabelle 8 20 µl RT-PCR - Ansatz

Substanz	Menge/Zeit	Anmerkung
RNA	2 µg	
Primer (random)	1 µl	
DEPC-H ₂ O	8,5 µl	
Inkubation	10 min	bei 70°C
Inkubation		Abkühlen auf Eis
Reaktionspuffer(5x)	4 µl	Reaktionspuffer Anlagerung der Primer
dNTP	2 µl (10 mM)	Substrat für Reverse- Transkriptase
Reverse Transkriptase (M-MuLV)	1 µl (200U)	
RNAse Inhibitor	0,5 µl	verhindert RNA-Abbau
DEPC-H ₂ O	1,5 µl	
Inkubation	10 min	bei Raumtemperatur (25°C)
Inkubation	1 h	bei 37°C
Inkubation	5 min	bei 85°C
Kühlung	Mindestens 5 min	bei 4°C

3.6 Real Time PCR

Die „Real Time“ PCR erlaubt es, die Produkte der PCR in Echtzeit zu messen. Das wird durch die Anlagerung von sogenannten Hydratisierungs-Sonden (TaqMan-Sonden) an die gesuchten Sequenzen oder durch Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBR Green möglich. SYBR Green absorbiert Licht einer Wellenlänge von 488 nm und emittiert es im grünen Spektrum bei 522 nm. Die Emission wird in jedem Zyklus gemessen und ändert sich in Abhängigkeit der vorliegenden DNA-Menge. Trägt man die Emission gegen die Zyklenzahl auf, ergeben sich unterschiedliche Berechnungsmöglichkeiten. Am gebräuchlichsten ist das Verfahren der relativen Quantifizierung, dazu bezieht man die Expression des gesuchten Gens auf „housekeeping“-Gene. Man geht davon aus, dass sich die housekeeping-Gene unter den verschiedenen zu untersuchenden Bedingungen nicht wesentlich in ihrer Expression ändern. Die Berechnungen erfolgten nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Diese Methode setzt eine gleiche Effizienz der abgelaufenen PCR-Reaktionen voraus. Beträgt diese 100%, so verdoppelt sich die DNA Menge in jedem Reaktionszyklus. Die Effizienz kann mit der Formel:

$$E = 10^{(-1/m)}$$

berechnet werden. Ct steht für Cycle Threshold (engl.), entspricht in etwa dem CP (engl.) und beschreibt den Übergang in den exponentiellen Bereich der Kurve. ΔCt gibt den Expressionsunterschied bezogen auf das housekeeping-Gen an.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct (ANP oder BNP)} - \text{Ct (GAPDH)}$$

Das „Delta-delta-Ct“ gibt die Genexpressionsdifferenz zwischen zwei Gruppen an, zum Beispiel einer Interventionsgruppe, mit Vorlast oder Nachlast, und einer Kontrolle.

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (Intervention)} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$$

Das $\Delta\Delta\text{Ct}$ kann zur Berechnung des „Ratio“ zwischen diesen Gruppen herangezogen werden, in dem man es als negativen Exponenten zur Zahl 2 setzt.

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Das verwendete housekeeping-Gen war GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), ein Enzym aus der Glykolyse. Eine absolute quantitative Bestimmung der eingesetzten cDNA ist auch möglich. Dazu wird eine Verdünnungsreihe der gesuchten Proben erstellt.

Tabelle 9 forward und reverse Primer für Real-Time PCR im humanen Gewebe

Primer	Sequenz
ANP forward	GAT AAC AGC CAG GGA GGA CA
ANP reverse	ATC ACA ACT CCA TGG GAA CA
BNP forward	TTC TTG CAT CTG GCT TTC CT
BNP reverse	AGG GAT GTC TGC TCC ACC
GAPDH forward	ATG ACA TCA AGA AGG TGG TG
GAPDH reverse	CAT ACC AGG AAA TGA GCT TG
JMJD1A forward	GAG CTG TTT CCC ACA CCG A
JMJD1A reverse	TGC TCT CCT TAG AAG GCT GTA GAC
JMJD2A forward	CGA GAG TTC CGC AAG ATA GC
JMJD2A reverse	CTC CTT TTC CAC CAA GTC CA
G9a forward	TGA CTG CGT GCT GTT ATT CC
G9a reverse	TGA TCT TCT CTG TGC GGA TG
LSD1 forward	ATC TGC AGT CCA AAG GAT GG
LSD1 reverse	GCC AAC AAT CAC ATC GTC AC
SUV39H1 forward	GGC AAC ATC TCC CAC TTT GT
SUV39H1 reverse	CAA TAC GGA CCC GCT TCT TA

Tabelle 10 TaqMan-Sonden (Applied Biosystems) Maus

Gen	TaqMan-Sonde
Nppa (ANP)	Mm01255770_g1
GAPDH	Mm99999915_g1

3.7 Working Heart

Die Working-Heart Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. med. Jan-Christian Reil durchgeführt. Vor der Organentnahme wurden den Tieren 100 IE Heparin intraperitoneal injiziert und die Tiere anschliessend durch Natrium-Phenobarbital in einer Konzentration von 65 mg/kg getötet. Das Herz wurde entnommen und in kardioplegischer Lösung gekühlt. Nach Freilegen und Präparation der Aorta wurde diese auf einer 18-G Metallkanüle mit 0,95 mm Innendurchmesser, 1,5 cm Länge und 1,30 mm Außendurchmesser aufgezogen. Das Herz wird in die Working-Heart-Anlage eingesetzt und retrograd mit 80 mmHg Perfusionsdruck von Krebs-Henseleit-Puffer (in mM: 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 4,7 KCl, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 2,25 CaCl₂, 0,5 EDTA und 11,1 Glucose) im Langendorff-Modus durchströmt. Es folgt die Präparation des linken Vorhofs, in den eine 1,5 cm lange 16G-Kanüle mit 1,14 mm Innendurchmesser und 1,52 mm Außendurchmesser eingenäht wird (Abb 13).

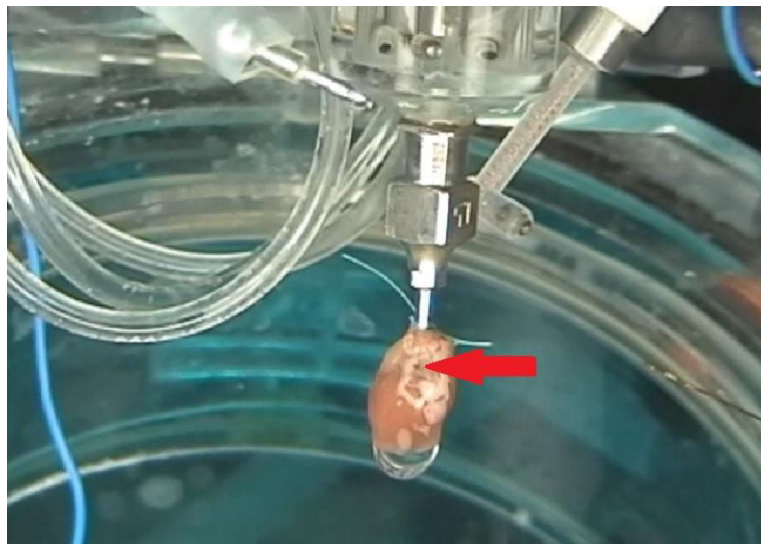


Abbildung 13 Abgeschlossene Präparation des linken Vorhofs

Eine Öffnung im linken Vorhof wurde freipräpariert, während das Herz retrograd im Langendorff-Modus perfundiert wird.

Die Fixierung der Kanüle, die an die Vorlastsäule angeschlossen ist, erfolgt durch eine Tabaksbeutelnaht mit Ethicon Prolen 7,0. Die experimentellen Bedingungen während der Perfusion waren 37°C, eine Vorlast von 10 mmHg und eine Nachlast von 80 mmHg in der Kontrollgruppe. Ein Schrittmacher, der aus zwei Platinstimulationselektroden besteht, die in Polyesterharz eingebettet sind, gewährleistete eine konstante Herzfrequenz von 400 bpm. Um die diastolische und systolische Funktion zu bestimmen, wurde von apikal in den linken Ventrikel durch ein kleines Loch, was mit einer 0,25 G Nadel vorgestochen wurde, ein Millar 1.4 F SPR-835 Katheter eingeführt. Die gemessenen Druck- und Volumenwerte wurden kontinuierlich aufgezeichnet.

Um die hämodynamischen Eigenschaften besser zu quantifizieren, sind verschiedene Interventionen nötig. Zur Bestimmung der enddiastolischen Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR) ist es nötig, die Vorlast rapide zu senken, zum Beispiel durch Entleeren der Vorlastsäule mit einer 50 ml Perfusorspritze. Mit dem EDPVR kann man Aussagen zur diastolischen Funktion des Herzens machen. Die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR) wird nach einer Aorten-Okklusion bestimmt, das Herz pumpt dabei kurzzeitig gegen einen erhöhten Widerstand. Die systolische Funktion kann so beurteilt werden. Das Herz-Zeit-Volumen (HZV) wurde ebenso bestimmt wie die Wanddicke des linken Ventrikels mit Hilfe der Saline-Vedünnungs-Methode (Abb. 14). Hier wird mit einer Bolus-Injektion von 5 ml hypertonem 5%igem NaCl eine Änderung der Leitfähigkeit im linken Ventrikel gegenüber dem Krebs-Henseleit-Puffer gemessen.

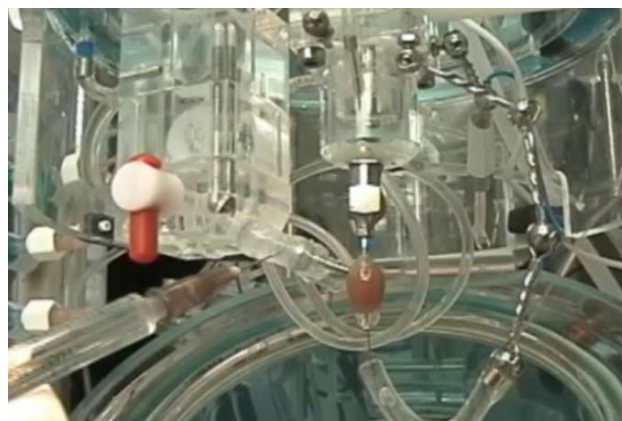


Abbildung 14 Saline-Messung

Durch die Saline-Injektion ist es möglich, die Wanddicke des Ventrikels abzuschätzen.

Die Parameter der Herzfunktion wurden unter kontinuierlicher Last gemessen und es wurde jeweils nur ein Wert geändert.

Es lagen folgende Parameter bei der Versuchsdurchführung vor:

Tabelle 11 Working-Heart Parameter

Parameter	Wert
Vorlast	10-12 mmHg
Erhöhte Vorlast (Preload-Gruppe)	30 mmHg
Nachlast	80 mmHg
Erhöhte Nachlast (Afterload-Gruppe)	120 mmHg
Herzfrequenz	400 Schläge pro Minute
Temperatur	37°C
Sauerstoffsättigung	99,00%

3.8 Statistische Analyse

Die ermittelten Daten der Genexpression und der Chip-Assays werden als Mittelwerte und Standard Error of the mean (SEM) dargestellt. Die Versuchstiere und das humane Myokard wurden mit den korrespondierenden Kontrolltieren oder Kontrollmyokard verglichen. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden durch einen Student's t-Test oder eine 1-way ANOVA Analyse, je nach Notwendigkeit, berechnet. Die statistische Analyse wurde unter Verwendung von GraphPad Prism (Version 4.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA) durchgeführt. Die Signifikanzwerte für die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurden wie folgt angenommen:

n.s. = $p > 0.05$	nicht signifikant
* $p \leq 0.05$	signifikant
** $p \leq 0.01$	sehr signifikant
*** $p \leq 0.001$	hochsignifikant

4.0 Geräte

Tabelle 12 Geräte

Name	Hersteller/Nummer	Funktion
Rotator	VWR Tube Rotator H803161	Inkubation
Zentrifuge	VWR Galaxy 16DH	Pelletisierung/ DNA-Aufreinigung
Kühlzentrifuge	Napco 2019R	Pelletisierung
pH- Meter	Eutech Instruments pH510	pH-Einstellung
Pipetten	VWR Ergonomic High- Performance Eppendorf Reference	Dosieren
PCR-Cycler	Peqlab Primus 96 advanced	PCR RT-PCR
Waage	Kern & Sohn GmbH Electronic Balance Typ: ABS 120-4	Masse Bestimmung
Waage	Kern EMB 600-2	Masse Bestimmung
Vortexmixer	Labnet International VortexMixer SN 41119039	Suspendieren
96-Well für Real- Time PCR	Applied Biosystems MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate	Real- Time RNA Bestimmung
Steuerung Sonifier	Branson Sonifier 250 41 Eagle Rd. Danbury	Steuerung der zugeführten Energie
Sonifier	Branson 102C	Chromatin Fragmentierung
Heizblock	Eppendorf Thermomixer comfort	Inkubation
Real- Time PCR	Applied Biosystems Step One Plus Real Time PCR	RNA-Bestimmung
Photometer	Beckman, Coulter DU 730	RNA-Mengenbestimmung
Gel-Foto- Dokumentation	Gene, Genius Bioimaging Stystems Gensnap	Auswertung/ Dokumentation Elektrophorese-Gele

4.1 Chemikalien/Kits

Tabelle 13 Chemikalien/Kits

Name	Hersteller	Funktion
Protein G Plus/ ProteinA-Agarose Beads	Calbiochem Cat.# IP10	Antikörper Bindung
PeqGold TriFast	Peqlab # 30-2020	RNA-Isolation
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen #28106	DNA-Aufreinigung nach Chip
DNAse I	Invitrogen 18068-015	DNA-Verdau
10x DNAse I Puffer	Invitrogen Y02340	DNA-Verdau
Proteinase K Solution RNA Grade	Invitrogen 25530-049	Proteinabbau
EDTA	Sigma #EDS-100	Pufferung
H ₂ O	Braun, Aqua ad iniectabilia	Lösungsmittel
KCL	Sigma #P9541	Pufferbestandteil
NaAc	Carl Roth #6773.1	Pufferung pH
NaCL	Carl Roth #9265.1	Pufferbestandteil
NaHCO ₃	VWR, Normapur #2056338	Pufferung
Tris	Carl Roth PUFFERAN® #AE15.1	Pufferbestandteil
1Kb Ladder	Sigma-Aldrich #D0428	Marker
Chloroform	Roth Trichlormethan/Chloroform #6340.4	Trennung der Nukleinsäuren
Isopropanol	MERCK; Emsure #603-117-00-0	Fällung
Ethanol	MERCK; Emsure #603-002-00-5	Fällung
DEPC-H ₂ O	1l H ₂ O +1ml DEPC über Nacht im Abzug durchmischen und autoklavieren	RNA-Reinigung
Formaldehyde	Sigma, #200-001-8	cross-linking

4.2 Antikörper

Tabelle 14 Antikörper

Name	Hersteller/	Bemerkung	Ziel
ab8898	abcam	Rabbit polyclonal	H3K9me3
ab1220	abcam	Mouse monoclonal	H3K9me2
ab6002	abcam	Mouse monoclonal	H3K27me3
ab40542	abcam	Rabbit polyclonal	G9a
#05-689	Millipore	Monoclonal (clone 15.19s2)	HP1alpha
ab70786	abcam	Rabbit polyclonal	JMJD2A/KDM4A
ab52002	abcam	Rabbit polyclonal	JMJD1A
ab12405	abcam	Mouse monoclonal	SUV39H1
ab17721	abcam	Rabbit polyclonal	LSD1
#05-623	Millipore	Monoclonal (clone CTD4H8)	Polymerase II
ab32356	abcam	Rabbit monoclonal	H3K4me2
ab8580	abcam	Rabbit polyclonal	H3K4me3

4.3 Puffer

Tabelle 15 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Chip-Sonification	1% Triton X-100 0,1% Deoxycholat 5 mM EDTA 50 mM Tris (pH= 8,1) 150 mM NaCl Proteinase-Inhibitor: 1 mM Aprotinin 1 mM Leukopeptin 0,5 mM PMSF
Elutionpuffer	1% SDS + 0,1 M NaHCO ₃
High-salt-wash	0,1% SDS 1% Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris (pH= 8,1) 500 mM NaCl
Lithium-wash	0,25 M LiCl 1% NP40 1% Deoxycholat 10 mM Tris (pH= 8,0) 1 mM EDTA
Low-salt-wash	0,1% SDS 1% Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris (pH= 8,1) 150 mM NaCl
PB	Geliefert von Quiagen
PE	Geliefert von Quiagen
TAE-Puffer 50x	Tris 242 g Eisessig 57,1 ml EDTA 5 mM, pH= 8 100 ml EDTA 0,5M (pH= 8,3)
TE	10 mM Tris (pH= 8) 0,1 mM EDTA
Laufpuffer qPCR	Bromphenolblau 0,2% (20 mg) 5 ml Glycerin 100% 4 ml EDTA 0,5M (pH= 8)
PBS (pH= 7,2)	170 mM NaCl 3,35 mM KCl 4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,84 mM KH ₂ PO ₄
RT-Reaktionspuffer (M-MuLV)	250 mM Tris-HCl (pH= 8,3) 250 mM KCl 20 mM MgCl ₂ 50 mM DTT

5.0 Ergebnisse

5.1 Einfluss der Histon-Methylierung auf die Expression von Hypertrophie-Markergenen bei chronischer Herzinsuffizienz

5.1.1 Charakteristische Veränderungen der Genexpression im menschlichen insuffizienten Myokard

ANP und BNP dienen als prognostische Faktoren und der Therapiekontrolle bei der Behandlung der Herzinsuffizienz (Troughton *et al.*, 2000; Metra *et al.*, 2007). Analytische Verfahren zur Bestimmung der ANP- und BNP-Konzentration haben mittlerweile Einzug in die Klinik gefunden. Die Bestimmung der mRNA-Expression der natriuretischen Peptide wurde bei den folgenden Experimenten genutzt, um das Vorliegen einer Herzinsuffizienz in den verwendeten Gewebeproben zu verifizieren. Als Kontrolle dienten nicht-insuffiziente Spenderherzen (NF), die aufgrund einer ABO-Inkompatibilität nicht transplantiert werden konnten. Da in den meisten Messungen keine Unterschiede zwischen Patienten mit dilatativer (DCM) und ischämischer Kardiomyopathie (ICM) bestanden, wurden diese zur Gruppe „Herzinsuffizienz“ (F, wie „failing“) zusammengefasst. Es zeigte sich im humanen insuffizienten Myokard eine vermehrte Expression von ANP und BNP gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 15).

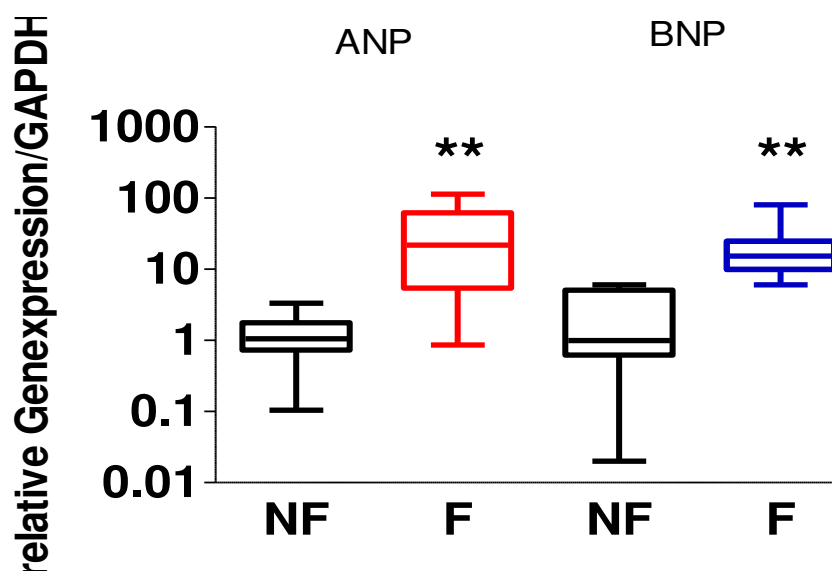


Abbildung 15 Erhöhte ANP und BNP Genexpression in insuffizientem Myokard

Quantitative Auswertung der real-time-PCR Experimente

Kontrollgruppe (NF, n=8), Herzinsuffiziente Gruppe (F, n=16) ** $p < 0.01$ vs NF

5.1.2 Herzinsuffizienz ist mit einer veränderten Histon-Methylierung der ANP und BNP Promotorregion assoziiert.

Für die Initialisierung der Transkription in den Promotorregionen von ANP und BNP spielen epigenetische Modifikationen eine wichtige Rolle. Methylierung von H3K4 führt zu einer Aktivierung der Genexpression, während H3K9 Di- und Trimethylierungen Gen-„silencing“ induzieren, d.h., das Abschalten von Genen (Barski *et al.*, 2007). Um zu untersuchen, ob die unterschiedliche ANP und BNP Genexpression mit einem unterschiedlichen Methylierungsmuster an H3K9 assoziiert ist, wurde dieses mittels ChIP-Assays analysiert. Als interne Kontrolle diente hierbei die Quantifizierung der H3K9 Methylierung des für GAPDH codierenden Gens. Im nicht-insuffizienten Myokard war die Di- (H3K9me2) und Trimethylierung (H3K9me3) in der Promoterregion des aktiv transkribierten Gens GAPDH deutlich geringer ausgeprägt als in den Promoterregionen von ANP und BNP, welche im gesunden Herzen „abgeschaltet“ sind. Es bestand auch kein Unterschied in der Di- und Trimethylierung von H3K9 am GAPDH-Promoter in nicht-insuffizientem und insuffizientem Myokard. Im Gegensatz dazu war in insuffizientem Myokard eine deutlich reduzierte Di- und Trimethylierung von H3K9 in den Promoterregionen von ANP und BNP zu beobachten, passend zu der erhöhten Genexpression auf mRNA Ebene (Abb. 16 und 17).

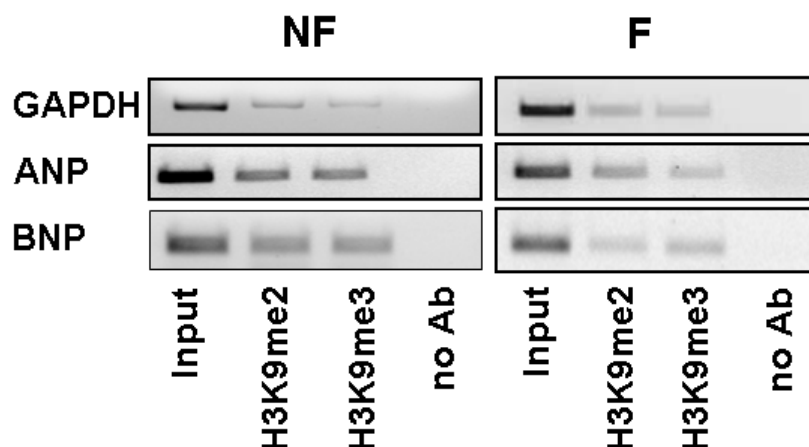


Abbildung 16 H3K9 Demethylierung der ANP und BNP Promotorregionen im insuffizienten Myokard

Repräsentative PCR eines ChIP-Assay Experimentes unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen di- (me2) und trimethyliertes (me3) H3K9. Das Präzipitat wurde anschliessend mittels PCR unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden, die komplementär zur Promotorregion von ANP, BNP und GAPDH binden, vervielfältigt. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Die Input-Kontrolle hat den Aufreinigungsprozess nach Fragmentation ohne spezifische Selektion durch Antikörperzugabe durchlaufen. Die no-AB-Kontrolle dient als negative Kontrolle durch nicht-spezifisch bindende Immunglobuline.

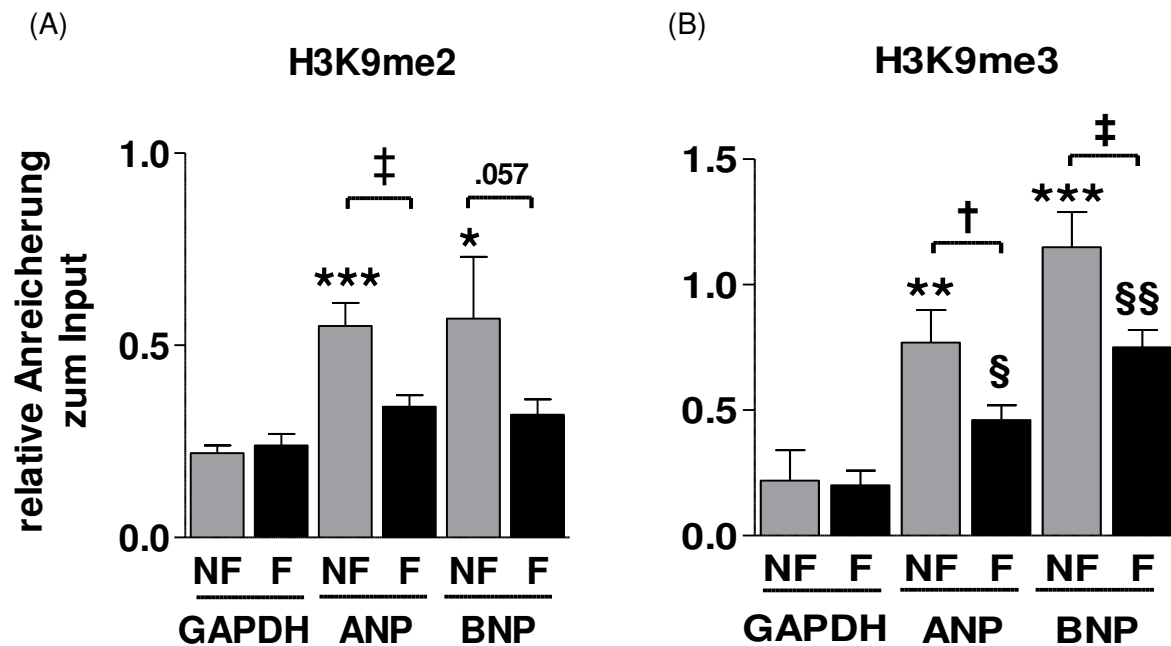


Abbildung 17 Quantifizierung der H3K9 Demethylierung der ANP und BNP Promotorregionen im insuffizienten Myokard

(A) Kumulative Analyse von Chromatin Immunopräzipitationen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern, die gegen den dimethylierten Lysinrest 9 von Histon 3(H3K9me2) gerichtet sind (NF, n = 8; F, n = 16)

(B) kumulative Analyse von Chromatin Immunopräzipitationen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern, die gegen den trimethylierten Lysinrest 9 von Histon 3(H3K9me3) gerichtet sind (NF, n = 8; F, n = 16)

* p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001 vs GAPDH / NF, bzw., § p < 0,05 und § § p < 0,01 vs GAPDH / F; † p < 0,05 und ‡ p < 0,01 vs NF bzw., no Ab: kein spez. Antikörper

5.1.3 H3K4-Methylierung der ANP und BNP Promotorregionen

Die Expression eines Gens kann positiv vom Methylierungsgrad des Lysinrestes 4 am Histon H3 beeinflusst werden. Eine dreifache Methylierung in der Promotorregion steht dabei für aktiv transkribierte Gene. Mit Hilfe von ChIP-Assay-Experimenten wurde daher der Methylierungszustand von H3K4me2/3 analysiert. Die H3K4-Methylierung der GAPDH-Promotorregion diente auch hier als endogene Kontrolle eines aktiv transkribierten Gens. Der Vergleich zwischen dem Kontroll-Myokard (NF) und dem insuffizienten Myokard zeigte keine signifikanten Änderungen bezüglich des Methylierungsgrades von H3K4me2/3 in den Promotorregionen von ANP, BNP und GAPDH (Abb. 18 und 19).

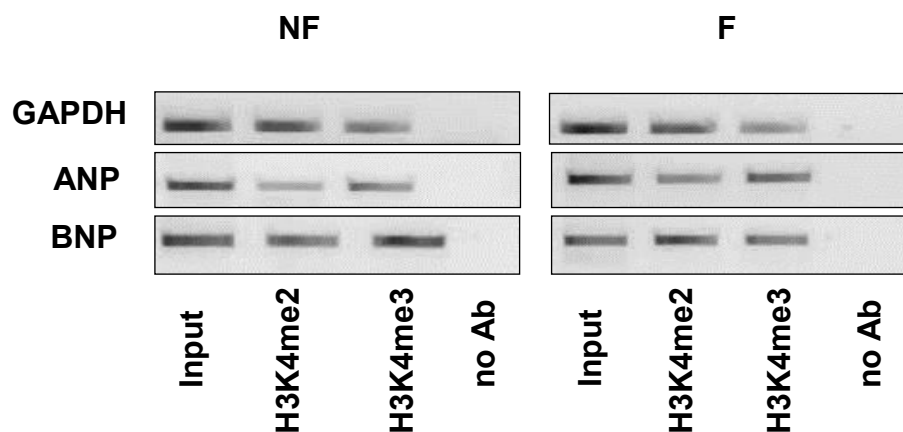


Abbildung 18 Unveränderte H3K4 Di- und Trimethylierung in den ANP und BNP Promotorregionen im insuffizienten Myokard

Repräsentative PCR eines ChIP-Assay Experimentes. Das Präzipitat wurde mittels PCR unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden, die komplementär zur Promotorregion von ANP, BNP und GAPDH binden vervielfältigt. Diese PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Input-Kontrolle hat den Aufreinigungsprozess nach Fragmentation ohne spezifische Selektion durch Antikörperzugabe durchlaufen. Die no-AB-Kontrolle dient als negative Kontrolle durch nicht-spezifisch bindende Immunglobuline.

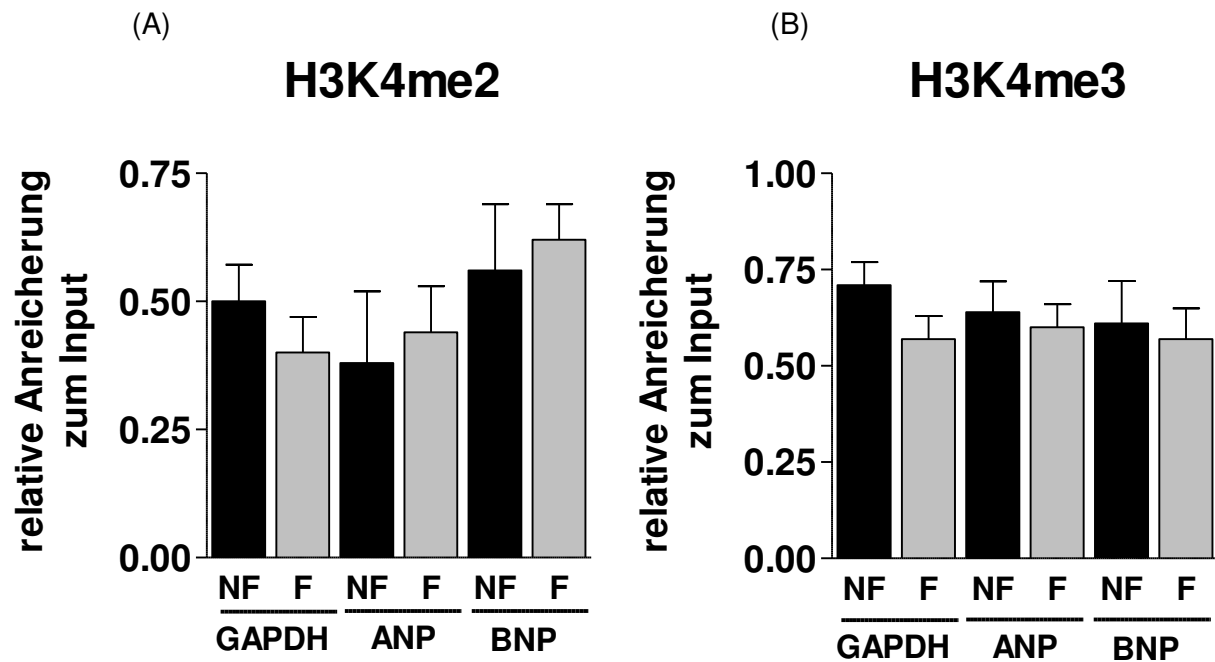


Abbildung 19 Analyse von H3K4me2/me3 in humanem Myokard

Kumulative Analyse von Chromatin Immunopräzipitationen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern, die gegen den dimethylierten Lysinrest 4 von Histon 3 (H3K4me2) gerichtet sind

(NF, n = 8; F, n = 16)

Kumulative Analyse von Chromatin Immunopräzipitationen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern, die gegen den trimethylierten Lysinrest 4 von Histon 3 (H3K4me3) gerichtet sind

(NF, n = 8; F, n = 16)

5.1.4 Insuffizientes Myokard zeigt reduzierte HP1-Bindung

Da H3K9me3 als eine Bindungsstelle für das Repressor-Protein HP1 dient, sollte diese Bindung im insuffizienten und gesunden Myokard untersucht werden (Bannister *et al.*, 2001). Die Analyse der HP1-Bindung an die Promotorregionen von ANP und BNP durch ChIP-Assays bestätigte diese Beobachtung, da die Assoziation von HP1 an die Promoterregion von ANP und BNP abnahm (Abb. 20).

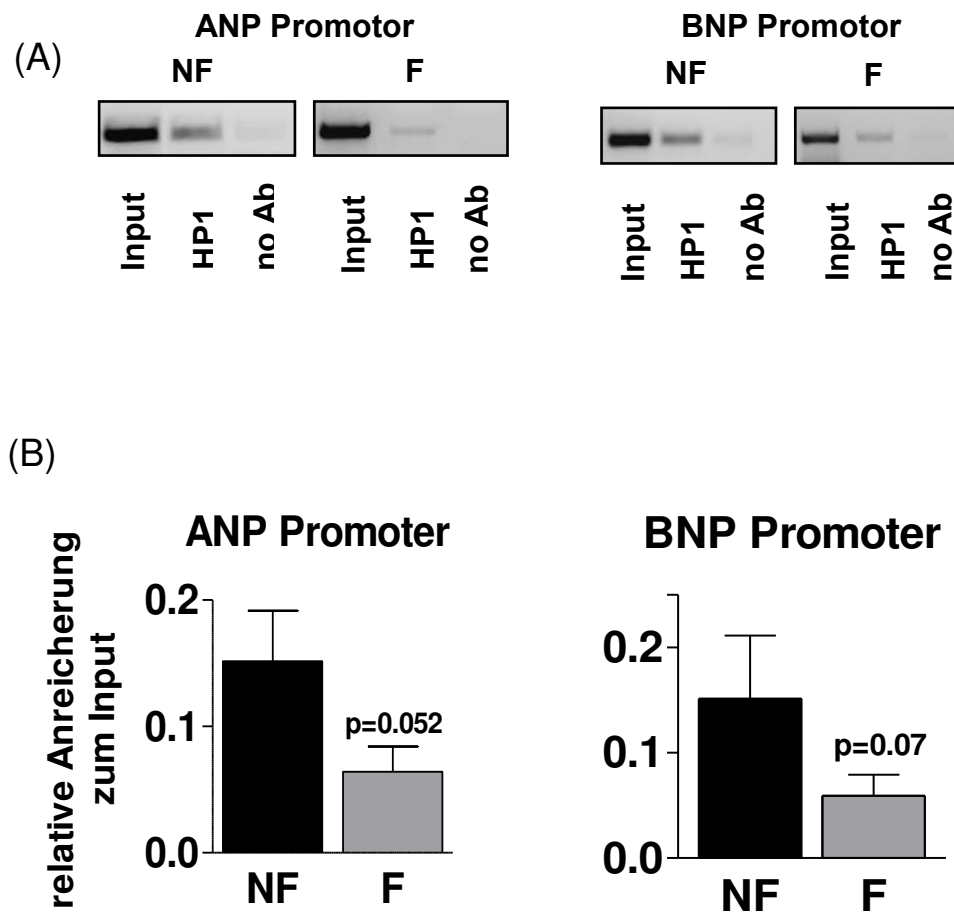


Abbildung 20 : Abnahme der HP1-Bindung am ANP- und BNP-Promotor

- (A) Das Präzipitat wurde mittels PCR unter Verwendung von spezifischen Oligonukleotiden, die komplementär zur Promotorregion von ANP und BNP binden amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. no Ab: unspezifischer Maus IgG-Antikörper
- (B) Kumulative Analysen der HP1-Bindung am ANP-Promotor (NF, n=8; F, n=16) und am BNP-Promotor (NF, n=8; F, n=16)

Die Input-Kontrolle hat den Aufreinigungsprozess nach Fragmentation ohne spezifische Selektion durch Antikörperzugabe durchlaufen. Die no-AB-Kontrolle dient als negative Kontrolle durch nicht-spezifisch bindende Immunglobuline.

5.1.5 Unveränderte Expression der Histon-modifizierenden Proteine LSD1, G9a und SUV39H1 bei Herzinsuffizienz

Um die zugrunde liegenden Mechanismen für einer vermehrte Demethylierung an H3K9 in menschlichem insuffizientem Myokard zu verstehen, wurde in weiteren Experimenten die mRNA-Expression Histon-modifizierender Enzyme bestimmt. Das Enzym G9a, welches hauptsächlich in euchromatischen Regionen lokalisiert ist, dimethyliert präferentiell H3K9 (Tachibana *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2009). Durch diese Histon-Modifikation wird ein repressiver Status erreicht und somit die Transkription vermindert. Die Histon-Methyltransferase SUV39H1 katalysiert die Trimethylierung von H3K9. Die Histon-Demethylase LSD1 ist hingegen verantwortlich für H3K4-Demethylierung, was zur transkriptionellen Inaktivierung führt. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede der Genexpression von G9a, SUV39H1 und LSD1 zwischen insuffizientem und nicht-insuffizientem Myokard (Abb. 21).

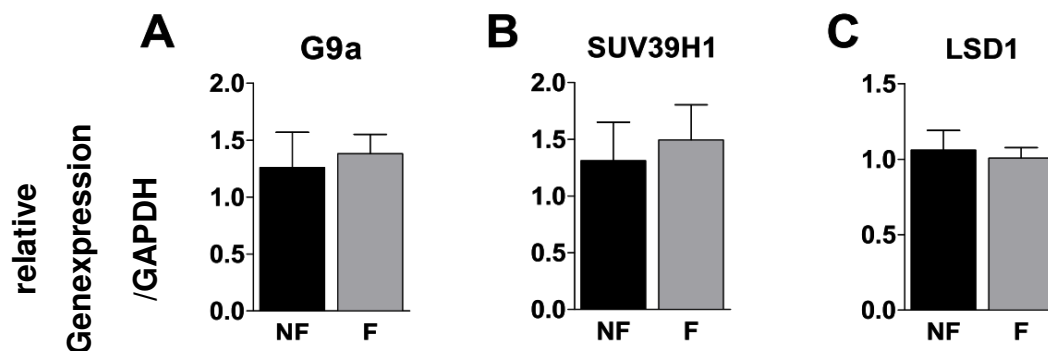


Abbildung 21 Keine Änderung der G9a, SUV39H1 und LSD1-Genexpression

Die Genexpression wurde nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode relativ zu der von GAPDH erfasst.

Kumulative Analysen (NF n = 5; F n = 12)

5.1.6 Erhöhte mRNA-Expression der Histon-Methyltransferasen JMJD1A und JMJD2A in insuffizientem Myokard

Der Methylierungsstatus der Histone wird durch Demethylasen und Methyltransferasen reguliert. Es ist bekannt, dass die spezifische Demethylierung von H3K9me2/3 von der Proteinfamilie JMJD2 durchgeführt wird, wohingegen H3K9me1/2-Methylierungen ein Substrat für die spezifischen Demethylasen JMJD1A darstellen (Shi *et al.*, 2007). Deshalb wurde die Genexpression verschiedener Histon-Demethylasen und Histon-Methyltransferasen in humanem LV-Myokard mittels Real-Time PCR überprüft. Es zeigte sich eine erhöhte Expression der Histon-Demethylasen JMJD1A und JMJD2A in insuffizientem Myokard (Abb. 22). Unterschiede zwischen Myokard von Patienten mit ICM oder DCM wurden nicht detektiert.

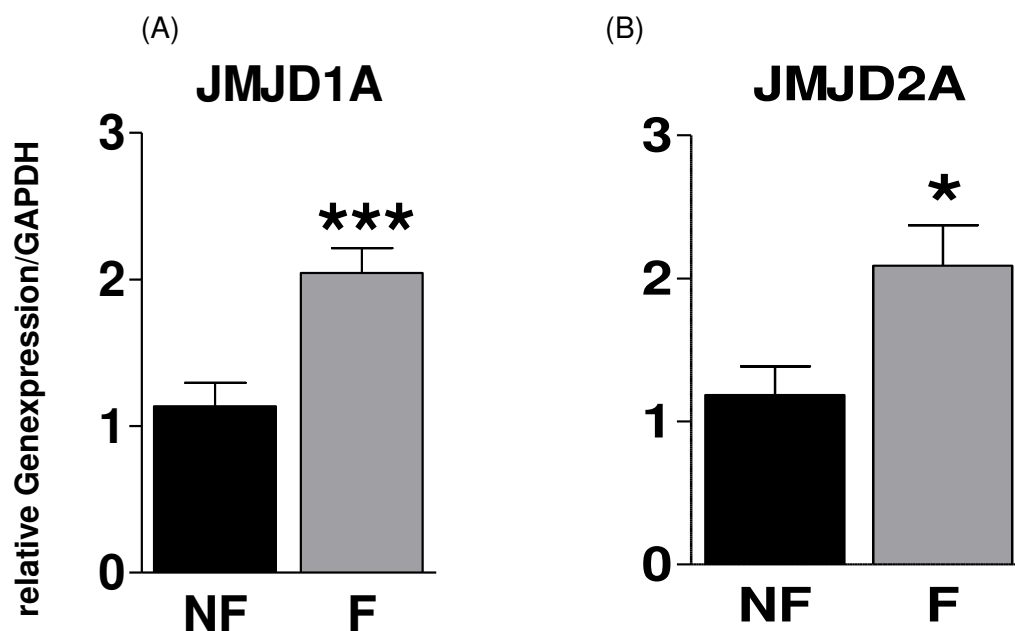


Abbildung 22 Gesteigerte Expression der Demethylasen JMJD1A und JMJD2A

Kumulative Analysen der real-time-PCR Experimente mit spezifischen Primern für die JMJD1A nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Kumulative Analysen der real-time-PCR Experimente mit spezifischen Primern für die JMJD2A nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

(NF, n = 8; F, n = 16), GAPDH als Referenz, * p < 0,05 und *** p < 0,001 vs NF

5.1.7 JMJD1A/JMJD2A Bindung am ANP-Promotor

Um zu untersuchen, ob es nach Heraufregulation der mRNA-Expression von JMJD1A und 2A auch zu einer vermehrten Assoziation der Demethylasen an der ANP-Promoterregion kommt, wurden ChIP-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen JMJD1A und JMJD2A durchgeführt. Hierin zeigte sich für JMJD1A keine Änderung im Myokard von Patienten mit ICM oder DCM, während ein Trend zu einer vermehrten Bindung der JMJD2A an die Promotorregion von ANP in ICM-, aber nicht DCM-Myokard gegenüber NF-Myokard festgestellt werden konnte (Abb. 23).

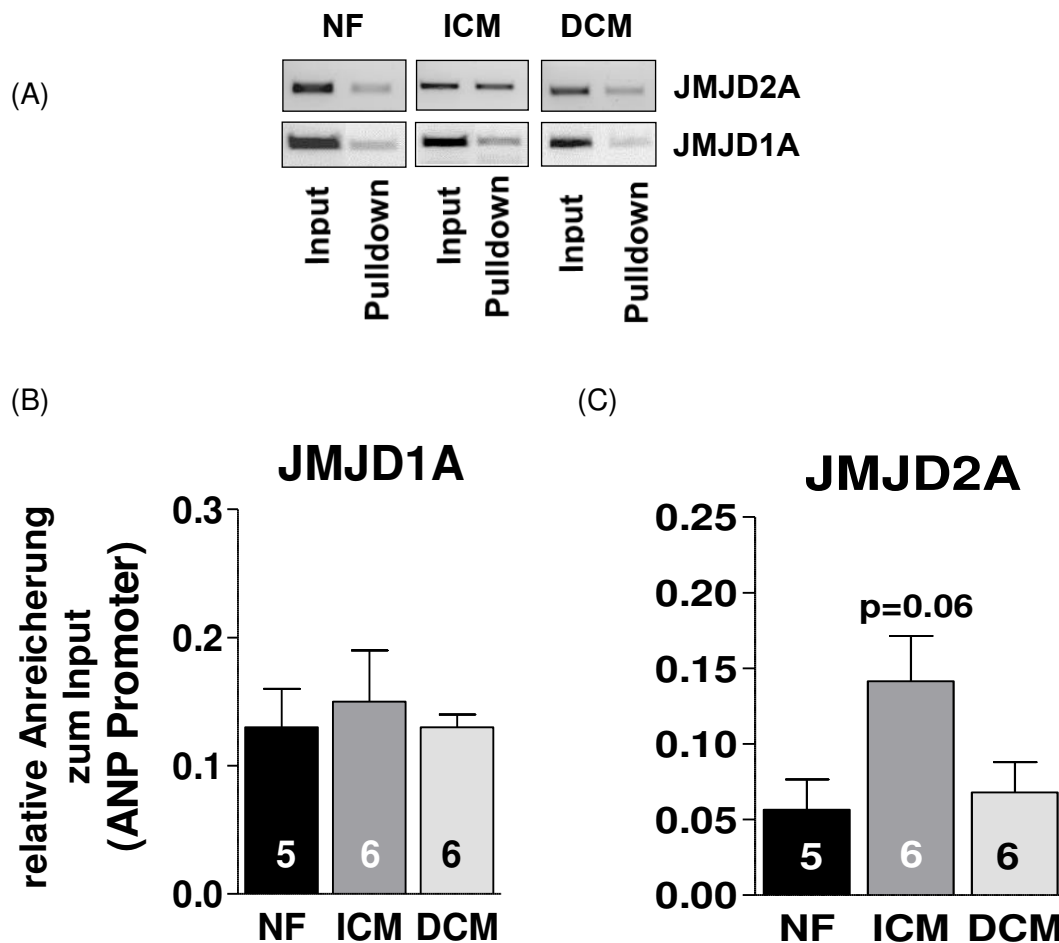


Abbildung 23 Rekrutierung der JMJD2A an die ANP-Promotorregion bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie

(A) Repräsentative PCR eines ChIP-Assay Experimentes

(B) Kumulativen Analyse von 6 Chip-Assays (Verwendung von spezifischen Antikörpern zur Bestimmung der JMJD1A-Bindung an der ANP-Promotorregion)

(C) Kumulativen Analyse von 6 Chip-Assays (Verwendung von spezifischen Antikörpern zur Bestimmung der JMJD2A-Bindung an der ANP-Promotorregion)

(NF, n = 5; ICM, n = 6; DCM, n = 6)

Die Input-Kontrolle hat den Aufreinigungsprozess nach Fragmentation ohne spezifische Selektion durch Antikörperzugabe (Pulldown) durchlaufen.

5.2 Einfluss der Histon-Methylierung auf die Expression von Hypertrophie-Markergenen bei akuter kardialer Vor- und Nachlast

5.2.1 Effekte der akuten kardialen Vor- und Nachlast auf die ANP-Expression

Es ist bekannt, dass es durch eine Erhöhung der transmuralen Wandspannung zu einer vermehrten Produktion und Sekretion von natriuretischen Peptiden aus LV-Myokard kommt. Dies kann durch eine erhöhte kardiale Vorlast (Preload) und/oder Nachlast (Afterload) verursacht werden. Im sogenannten "Working-Heart"-System können die kardiale Vor- und Nachlast unabhängig voneinander variiert werden, ohne dass neurohumorale Faktoren, wie zum Beispiel Katecholamine oder das Renin-Angiotensin-Aldosteron System, auf die Kardiomyozyten einwirken. Isolierte Maus Herzen wurden für 30 min, 60 min und 90 min einer erhöhten Vorlast von 30 mmHg oder einer erhöhten Nachlast von 120 mmHg ausgesetzt und mit einer Kontrollgruppe verglichen, bei der die Vorlast bei 10 mmHg und die Nachlast bei 80 mmHg in physiologischen Bereichen belassen wurden. Die Herzen wurden schockgefroren und später biochemisch analysiert.

Unsere Daten zeigten, dass sowohl eine Erhöhung der Vor- als auch der Nachlast zu einer erhöhten ANP-mRNA-Expression führte, die nach 60 min das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ überschritt (Abb. 24).

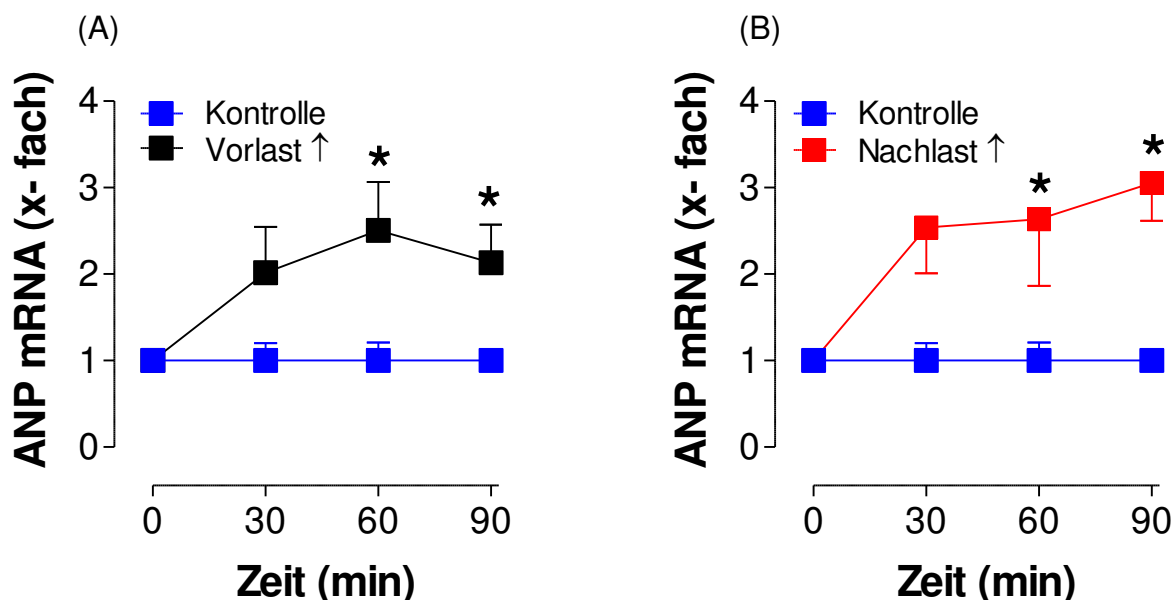


Abbildung 24 Akute hämodynamische Belastung steigert die ANP-Genexpression

Zeitlicher Verlauf der relativen Genexpression von ANP-mRNA im Bezug zur GAPDH-Expression ermittelt durch Real-Time-PCR Analysen

(A) Erhöhung der Vorlast auf 30 mmHg

(B) Erhöhung der Nachlast auf 120 mmHg

* $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe (10 mmHg Vorlast und 80 mmHg Nachlast)

5.2.2 H3K9-Demethylierung als schnelle epigenetische Veränderung im Myokard

Für die folgenden Experimente wurde Myokard verwendet, das einer 60-minütigen Vorlasterhöhung ausgesetzt war. Mittels ChIP-Assay konnte nach Zunahme der Vorlast eine Abnahme der H3K9 Di- und Trimethylierung in der Promotorregion von ANP nachgewiesen werden (Abb. 25). Im Gegensatz dazu zeigte sich keine Veränderung der H3K27-Methylierung. (Abb. 25 A-D).

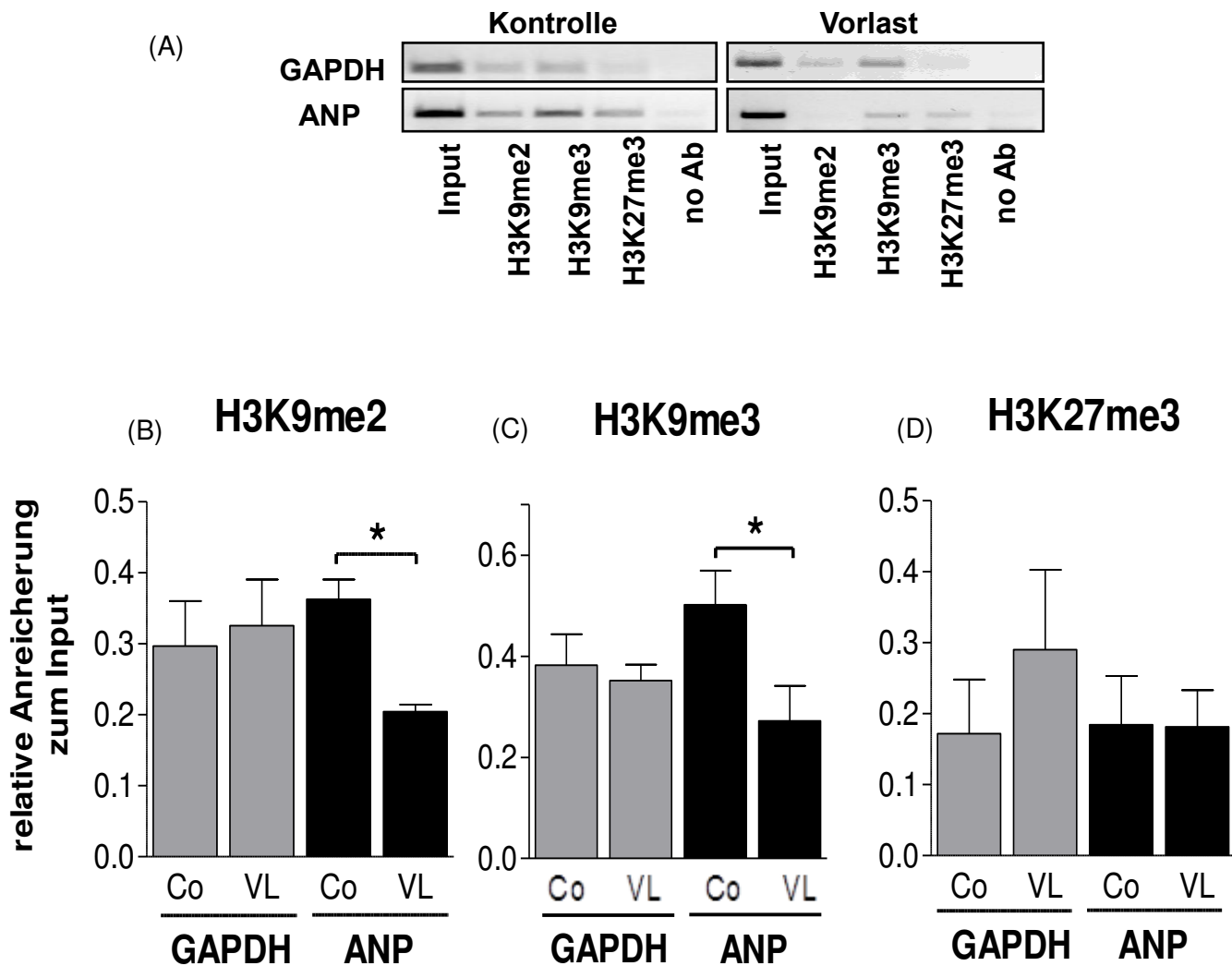


Abbildung 25 Eine erhöhte Vorlast induziert H3K9me2/me3 Demethylierung in der ANP-Promotorregion

(A) Repräsentative PCR eines ChIP-Assay Experimentes

(Kontrolle (Co): 10 mmHg, Vorlast (VL): 30 mmHg)

Quantitative Auswertung der Chromatin Immunopräzipitationen für die Methylierung von

(B) H3K9me2

(C) H3K9me3

(D) H3K27me3 in der Promotorregion von ANP (Co n=4, VL n=6) *p< 0,05 vs. Kontrolle

Die Input-Kontrolle hat den Aufreinigungsprozess nach Fragmentation ohne spezifische Selektion durch Antikörperzugabe durchlaufen. Die no-AB-Kontrolle dient als negative Kontrolle durch nicht-spezifisch bindende Immunglobuline.

5.2.3 Reduzierte HP1-Bindung an die ANP-Promotorregion nach akuter Zunahme der kardialen Vorlast

Die Bindung von HP1 an H3K9me3 in einer Promotorregion spricht für eine reprimierende Chromatinstruktur und geht mit einem „silencing“ der Genexpression einher (Vogel *et al.*, 2006, Nielsen *et al.*, 2001). Da eine 60-minütige Vorlasterhöhung eine deutliche Abnahme der H3K9-Methylierung herbeigeführt hatte, wurde nun die Bindung des Repressorproteins HP1 an die ANP-Promoterregion analysiert. Diese ChIP-Analysen zeigten eine deutlich reduzierte HP1-Bindung an den Promotor von ANP nach 60-minütiger Vorlasterhöhung (Abb. 26).

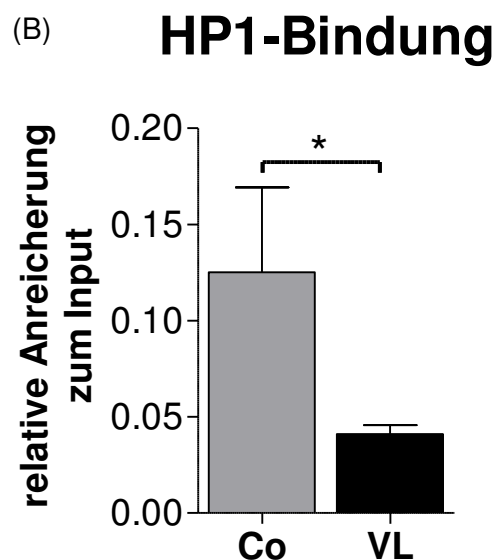
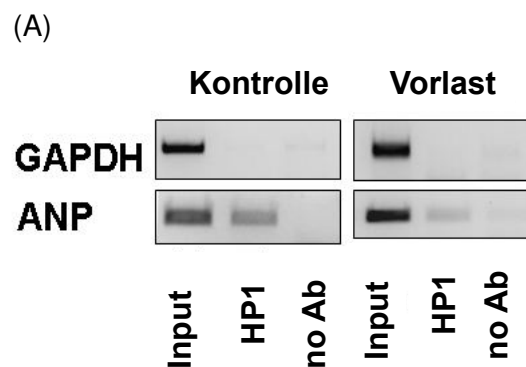


Abbildung 26 Hämodynamische Belastung vermindert die HP1-Bindung am Promotor von ANP

(A) Repräsentative PCR eines ChIP-Assay Experimentes (Kontrolle (Co): 10 mmHg, Vorlast (VL): 30 mmHg)
 (B) Kumulative Analyse von ChIP-Assay-Experimenten. Dargestellt ist die HP1-Bindung an der Promotorregion von ANP (Co n=4, VL n=6), *p< 0,05 gegen Kontrolle

Die Input-Kontrolle hat den Aufreinigungsprozess nach Fragmentation ohne spezifische Selektion durch Antikörperzugabe durchlaufen. Die no-AB-Kontrolle dient als negative Kontrolle durch nicht-spezifisch bindende Immunglobuline.

5.3 Einfluss der Histon-Deacetylase 4 auf die Reaktivierung des fetalen Genes ANP

5.3.1 Basale Expression von ANP in der HDAC4-KO-Maus

HDACs der Klasse II spielen eine wichtige Rolle bei der kardialen Hypertrophie durch Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor MEF2. Inwiefern epigenetische Modifikationen im Sinne von Histon-Modifikationen hierbei eine Rolle spielen, ist weitgehend unbekannt. Da HDACs Histon-Deacetylasen sind, wäre ein Einfluss auf die Histon-Acetylierung zu erwarten. In Untersuchungen unserer Gruppe beobachteten wir allerdings, dass trotz nukleärem HDAC4-Export im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz die Acetylierung von H3K9 und H3K27 in den Promoterregionen von ANP und BNP nicht differentiell acetyliert waren. Frühere *in vitro* Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass HDAC4 durch Interaktion mit der Histon-Methyltransferase SUV39H1 und HP1 die H3K9-Methylierung kontrollieren kann (Zhang et al., 2002). Um zu untersuchen, ob HDAC4 eine kausale Rolle für die H3K9-Demethylierung und die Regulation der ANP-Expression spielt, setzten wir isolierte Herzen von Mäusen mit kardiomyozyten-spezifischer Deletion von HDAC4 (HDAC4-KO) und deren Wild-Typ Geschwistertieren (WT) einer normalen oder einer erhöhten Vorlast im „Working Heart“-System aus. Unter normaler Vorlast zeigte sich in den HDAC4-KO-Maus-Herzen bereits eine basal um 3.6-fach erhöhte mRNA-Expression von ANP. Eine Erhöhung der Vorlast auf 30 mmHg resultierte in den WT-Herzen – ähnlich dem Befund in CD1-Mäusen (Abb. 24A) – in einer Heraufregulation der ANP-Expression, während dies in den HDAC4-KO-Maus-Herzen komplett verhindert war (Abb. 27).

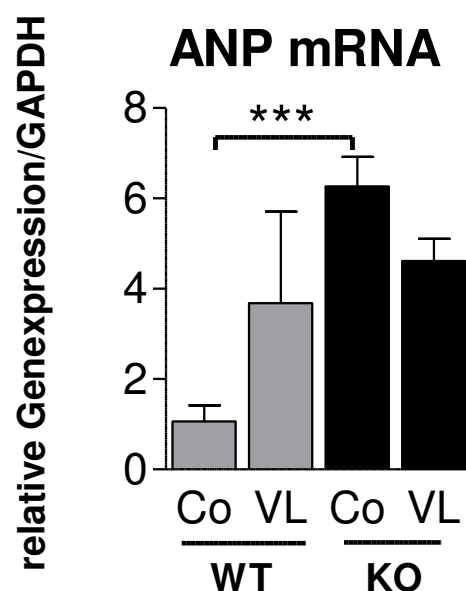


Abbildung 27 Keine Erhöhung der ANP Genexpression in HDAC4- KO Mäusen

ANP-mRNA-Expression in Wurfgeschwister-Gruppe (WT) und HDAC4-KO (KO) Herzen nach 60 min erhöhter Vorlast.

(Kontrolle(Co): 10 mmHg, Vorlast(VL): 30 mmHg), (Co n=4, VL n=5), ***p<0,0001 vs Kontrolle

5.3.2 Die zentrale Rolle der HDAC4 für die H3K9-Demethylierung

Um zu untersuchen, ob die unterschiedliche ANP-Expression auf unterschiedliche H3K9-Methylierung zurückzuführen ist und insbesondere, ob HDAC4 eine kausale Rolle für die Regulation von H3K9-Methylierung spielt, wurde die H3K9-Methylierung in der ANP-Promoterregion analysiert. Nach 60 min erhöhter Vorlast zeigte sich – entsprechend der Ergebnisse in CD1-Mäusen (Abb. 25) – eine reduzierte H3K9 Di- und Trimethylierung von H3K9 in WT-Mäusen (Abb. 28, graue Balken), wohingegen in HDAC4-KO-Mäusen die basale H3K9-Methylierung bereits deutlich reduziert war und unter Zunahme der Vorlast sogar (paradoxe Weise) zunahm (Abb. 28; schwarze Balken). Ähnliche Beobachtungen konnten wir bei der Analyse der H3K27-Methylierung machen, allerdings waren die Effekte hier nicht signifikant (Abb. 28).

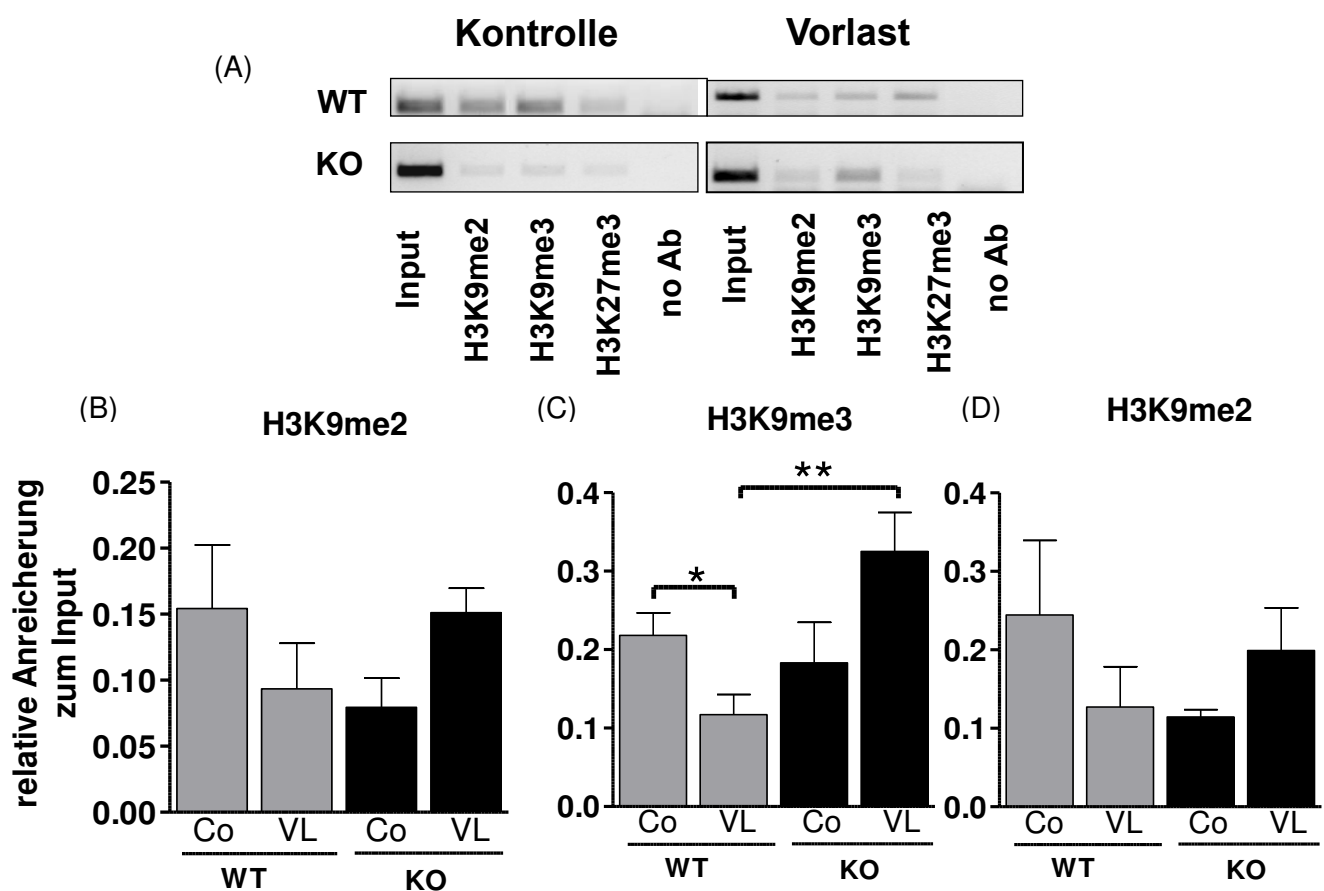


Abbildung 28 HDAC4 steuert H3K9-Demethylierung am ANP-Promotor

Vergleich von Wurfgeschwister (WT) und HDAC4-KO (KO) Myokard.

(A) Repräsentative PCR eines ChIP-Assay Experimentes (Kontrolle (Co): 10 mmHg, Vorlast(VL): 30 mmHg)

(B) Kumulative Analyse der Chip-Assay Experimente mit Antikörpern gegen H3K9me2

(C) Kumulative Analyse der Chip-Assay Experimente mit Antikörpern gegen H3K9me3

(D) Kumulative Analyse der Chip-Assay Experimente mit Antikörpern gegen H3K27me3

(Co n=4, VL n=5), *p< 0,05 vs WT-Kontrolle, ** p <0,01 vs WT-Vorlast

Die Input-Kontrolle hat den Aufreinigungsprozess nach Fragmentation ohne spezifische Selektion durch Antikörperzugabe durchlaufen. Die no-AB-Kontrolle dient als negative Kontrolle.

5.3.3 HP1-Bindungsverhalten in der HDAC4-KO-Maus

Aufgrund der gegenläufigen Ergebnisse hinsichtlich der H3K9 Methylierung in HDAC4-KO-Mäuseherzen nach Erhöhung der Vorlast wurde auch das Bindungsverhalten von HP1 in den HDAC4-KO-Tieren analysiert. Ähnlich dem H3K9-Profil beobachteten wir hier eine Zunahme der HP1-Bindung an die Promotorregion von ANP in der HDAC4-KO-Gruppe unter einer erhöhten linksventrikulären Vorlast, während die HP1-Bindung im Myokard der WT-Mäuse unter erhöhter Vorlast abnahm (Abb. 29).

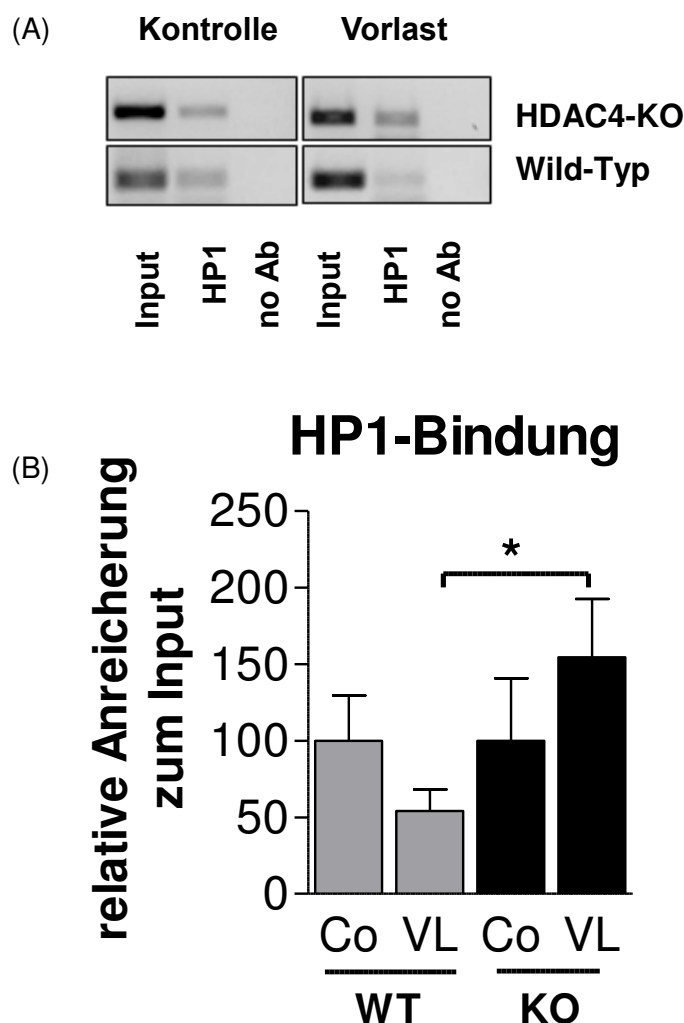


Abbildung 29 Zunahme der HP1-Bindung am Promotor von ANP

(A) Repräsentative PCR eines ChIP-Assay Experimentes

(Kontrolle (Co): 10 mmHg, Vorlast (VL): 30 mmHg) Wurfgeschwister (WT), Knock-out (HDAC4-, KO)

(B) Kumulative Analyse der HP1-Bindung am ANP-Promotor

(Co n=4, VL n=4) * $p < 0,05$ HDAC4-KO Vorlast gegen WT Vorlast

Die Input-Kontrolle hat den Aufreinigungsprozess nach Fragmentation ohne spezifische Selektion durch Antikörperzugabe durchlaufen. Die no-AB-Kontrolle dient als negative Kontrolle durch nicht-spezifisch bindende Immunglobuline.

6.0 Diskussion

6.1 Epigenetische Modifikationen bei chronischer Herzinsuffizienz

Anhaltende neuroendokrine Aktivierung, aber auch erhöhte kardiale Vor- und Nachlast können letztendlich zu einer ventrikulären Hypertrophie führen, die im weiteren Verlauf in eine Dilatation mit Verschlechterung der Kontraktilität mündet. Ein charakteristisches Merkmal ist hierbei die Reaktivierung eines fetalen Genprogramms, dessen Gene zum Teil adaptive, aber auch maladaptive Prozesse induzieren. Im Zuge dieser sog. „Remodeling“-Prozesse kommt es zur vermehrten Expression natriuretischer Peptide (ANP und BNP) sowie minder kontraktiler fetaler Filamente wie Myosin-Heavy-Chain-Beta (MHC-Beta) und alpha Skeletal Aktin (α Ska). Auch die Genexpression anderer Gene, die zur Regulation des Ca^{2+} -Haushalts in Kardiomyozyten beitragen, ändern sich. Hier ist insbesondere eine Herabregulation der SR Ca^{2+} ATPase (SERCA) zu nennen (Wang *et al.*, 2011), die zur verringerten Ca^{2+} -Beladung des SRs führt, was letztlich zur kontraktilen Dysfunktion mit beiträgt. Im Zuge des kardialen Remodelings kommt es ebenfalls zu einer Re-Expression der T-Typ Ca^{2+} -Kanäle, deren Heraufregulation pro-arrhythmische Effekte zugeschrieben werden (Kinoshita *et al.*, 2009; Kuwahara *et al.* (2003). In der Summe münden diese Vorgänge letztendlich in veränderten strukturellen, kontraktilen und elektrophysiologischen Eigenschaften des insuffizienten Myokards.

Aus früheren Untersuchungen an menschlichem Myokard, aber auch aus Tiermodellen der Herzinsuffizienz ist bekannt, dass es bei Herzinsuffizienz zu Modifikationen der Histon-Methylierung, insbesondere an H3K4 und H3K9 kommt (Kaneda *et al.*, 2009). Diese Arbeiten beschreiben aber nur die globalen Veränderungen der Methylierungsmuster, ohne in genauerem Detail die epigenetische Regulation einzelner Gene unter Einbeziehung der upstream und downstream gelegenen Kaskaden zu analysieren (Kaneda *et al.*, 2009). Völlig unklar bleibt weiterhin, ob diese Veränderung des Methylierungsmusters Auslöser oder Folgeerscheinung der kardialen Erkrankung ist (Stein *et al.*, 2011). Trotz des Wissens über Histon-Methyltransferasen und Demethylasen gibt es überraschend wenige Informationen über ihren Einfluss bei der Regulierung der Herzhypertrophie und die tatsächlich vorherrschenden epigenetischen Modifikationen. In dieser Arbeit wurde erstmals die Histon-Methylierung an H3K9 und H3K4 in den Promotorregionen der Gene ANP und BNP in menschlichem LV-Myokard analysiert, da diese Gene während des kardialen Remodelings im Progress der Herzinsuffizienz verändert exprimiert werden. Neben der Charakterisierung des „epigenetischen Codes“ an diesen Genen wurden auch die in Frage kommenden, upstream gelegenen Regulationsprozesse näher beleuchtet. Wir beobachteten, dass die spezifischen H3K9-Histon-Demethylasen JMJD1A und JMJD2A in menschlichem insuffizienten Myokard vermehrt exprimiert werden, während die Expression anderer Histon-modulierender Enzyme, die die Methylierung beeinflussen wie G9a, SUV39H1 und

LSD1 nicht unterschiedlich reguliert waren. Auch konnten wir in terminal insuffizienten Herzen erstmals eine Abnahme der Di- und Tri-Methylierung von H3K9 in den Promotorregionen von ANP und BNP identifizieren, sowie eine daraus resultierende reduzierte Bindung des Korepressors HP1. Die Abnahme dieser beiden Parameter spricht für eine offene Chromatinstruktur und ermöglicht so den Zugang von Transkriptionsfaktoren zu den Promotorregionen der natriuretischen Peptide. Dies ist mit der von uns beobachteten Genaktivierung im Einklang.

Die Tri-Methylierung von H3K4 geht in verschiedenen Geweben mit einer verstärkten Genexpression einher (Jenuwein und Allis, 2001; Santos-Rosa *et al.*, 2002). Im humanen insuffizienten Myokard konnte jedoch keine Änderung im Methylierungszustand von H3K4 in der Promotorregion von ANP und BNP beobachtet werden (Abb. 19). Stein *et al.* konnten zeigen, dass die gezielte und systematische Reduktion der H3K4-Trimethylierung (durch einen transgenen Ansatz *in vivo*) in adulten, bereits ausdifferenzierten Kardiomyozyten zu einem global veränderten Genexpressions-Profil führt. Der Effekt auf die Expression fetaler Gene war jedoch variabel. So zeigte die Reduktion von H3K4me3 auf die Transkription des natriuretischen Peptids BNP und des fetalen Myofilaments MHC-Beta keinen Einfluss, führte jedoch zu einer gesteigerten ANP-Expression und gleichzeitig zu einer verringerten alpha-Skeletal Aktin mRNA-Expression (Stein *et al.*, 2011). Diese Daten machen deutlich, dass Veränderungen der Histon-Methylierung alleine eine Gen-Aktivierung *in vivo* verursachen kann, was eine detaillierte Analyse der epigenetischen Modifikationen bei chronischer Herzinsuffizienz rechtfertigt. Unsere Analysen am humanen insuffizienten Myokard zeigten zwar eine deutlich erhöhte Expression von ANP und BNP, doch war diese mit keiner Änderung des Methylierungsgrades von H3K4 in den Promotorregionen assoziiert. Wir folgern daraus, dass die Reaktivierung dieser Gene keiner Änderung der H3K4-Methylierung bei chronischer Herzinsuffizienz bedarf.

Im Gegensatz zur H3K4-Methylierung steht die Methylierung von H3K9 als Marker für Genrepression und längerfristiges „Gene Silencing“ (Jenuwein und Allis, 2001). Die Methylierung dieses Lysinrestes wird von der Histon-Methyltransferase SUV39H1 katalysiert (Melcher *et al.*, 2000, Nielsen *et al.*, 2001) und bildet damit eine Bindestelle für ein weiteres Repressorprotein, Heterochromatin Protein 1 (HP1) (Lachner *et al.*, 2001). In den letzten Jahren wurde immer mehr über die dynamische Regulation der Histon-Methylierung bekannt. *Db/Db*-Mäuse sind ein etabliertes Model zur Untersuchung von Diabetes mellitus Typ 2. Diese Mäuse wiesen bereits basal eine gesteigerte inflammatorische Genexpression und eine starke Hypersensibilisierung gegenüber TNF-alpha auf. Villeneuve *et al.* zeigten, dass aus diabetischen Mäusen isolierte glatte Gefäßmuskelzellen sowohl eine reduzierte H3K9-Methylierung, als auch einen geringeren SUV39H1-Proteingehalt aufwiesen und dass die Rekrutierung des Korepressors HP1 an die Promotoren inflammatorischer Gene ebenfalls stark reduziert war (Villeneuve *et al.*, 2008). Auch

Nierenschäden und die daraus resultierenden metabolischen Abnormalitäten, wie zum Beispiel eine Albuminurie und eine reduzierte glomeruläre Filtrationsrate, nehmen Einfluss auf die kardiale Genexpression. So zeigten *Db/Db*-Mäuse, denen operativ eine Niere entfernt wurde, eine reduzierte H3K9-Dimethylierung kardialer Gene (Gaikwad *et al.*, 2010). Schließlich konnte auch gezeigt werden, dass eine erhöhte Zytokin-Expression, wie etwa Interleukin 6 (IL-6), die maßgeblich bei der Entstehung des sogenannten „metabolic memory“ bei Diabetes mellitus eine Rolle spielt, durch eine veränderte H3K9-Methylierung am IL6-Promotor sowie die Herunterregulierung der H3K9-Methyltransferase SUV39H1 begünstigt wird (Yu *et al.*, (2012)).

Unsere Daten am LV-Myokard von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zeigen deutlich, dass die gesteigerte Expression von ANP und BNP mit einer signifikanten Reduktion der reprimierenden H3K9-Methylierung assoziiert ist. Wir konnten zwar keine Expressionsabnahme der Histon-Methyltransferase SUV39H1 detektieren, doch konnten wir deutlich eine reduzierte Rekrutierung des Repressors HP1 an den untersuchten Promotorregionen nachweisen. Das Heterochromatin Protein 1 (HP1) hat als Marker für Heterochromatin durch seine Bindung an H3K9me3 enorme Bedeutung für die Kondensation des Chromatins (Lomberk *et al.*, 2006). Im humanen insuffizienten Myokard zeigte sich eine Abnahme der Bindung von HP1 an die Promotorregionen der natriuretischen Peptide im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Abb.20).

Die verminderte Bindung von HP1 an die Promotorregionen korrelierte negativ mit der gesteigerten Genexpression. Die Dissoziation von HP1 aus der Promotorregion kann als Zeichen einer aufgelockerten Chromatinstruktur gewertet werden (Zhang und Reinberg, 2006). HP1 interagiert mit diversen Transkriptionsfaktoren, DNA-Methyltransferasen und regulatorisch modifizierten Proteinen wie zum Beispiel „MITR“, dem „myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-interacting transcription repressor“, HDAC4 und HDAC5 (Lomberk *et al.*, 2006). So entsteht ein möglicher Zusammenhang zwischen HDAC4 Export, HP1 Dissoziation und Demethylierung von H3K9. Zhang *et al.* haben in Zellkultursystemen eine Assoziation zwischen HDAC4 und HP1 mit der Methyltransferase SUV39H1 beschrieben (Zhang *et al.*, 2001, 2002). Durch die Dissoziation von HDAC4, SUV39H1 und HP1 von der Promotorregion für ANP könnte sich somit das Gleichgewicht zu Ungunsten der Methylierung und zu Gunsten einer Demethylierung verschieben.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten liefern einen ersten Einblick in den Methylierungsstatus von H3K9 und H3K4 bei terminaler Herzinsuffizienz. Ursache für die Verschiebungen des Gleichgewichts zwischen der Methylierung und Demethylierung von H3K9 zu Gunsten der Demethylierung könnte eine gesteigerte Genexpression der Histon-Demethylasen sein, die in einer erhöhten Bindungswahrscheinlichkeit mündet. Auf der Methylierungsseite dieses Gleichgewichts wurden die Proteine G9a und SUV39H1 betrachtet.

Das Protein G9a überträgt Methylgruppen in euchromatischen Genregionen auf H3K9 und H3K27 und dimethyliert diese Lysinreste (Tachibana *et al.*, 2001). In embryonalen Mausstammzellen induziert G9a die Hypoxie-vermittelte H3K9-Dimethylierung und ist essentiell für die frühe Embryogenese durch eine transkriptionelle Repression von fetalen Genen (Chen *et al.*, 2006; Tachibana *et al.*, 2002). Im Myokard mit ausdifferenzierten humanen Kardiomyozyten zeigte sich keine Änderung der G9a-Genexpression (Abb. 21). Folglich scheint ihr Einfluss auf die Expression der natriuretischen Peptide gering zu sein.

SUV39H1 wird in erster Linie eine dominante Rolle bei der Genrepression durch H3K9 Trimethylierung im Heterochromatin zugeschrieben (Melcher *et al.*, 2000). SUV39H1 erzeugt trimethyliertes H3K9 und damit eine Bindungsstelle für das Protein HP1 (Lachner *et al.*, 2003). Die Präsenz von SUV39H1 reprimiert Muskelgen-Expression und Differenzierung in Myoblasten, aber auch durch Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor MyoD (Mal, 2006). Trotz der unveränderten Genexpression (Abb. 21) besteht die Möglichkeit, dass SUV39H1 die Genaktivierung indirekt durch Interaktion mit MyoD hemmt. MyoD und MEF2 aktivieren Muskelgene. Ihre Aktivität wird durch Bildung eines Komplexes mit MEF2 interagierenden Proteinen (MITR, HP1 α , SUV39H1, HDAC4) reprimiert (Mal, 2006, Backs *et al.*, 2006). In unseren Experimenten war die mRNA Expression von SUV39H1 in insuffizientem Myokard nicht verändert. Wir untersuchten daher auch die Rekrutierung von SUV39H1 an die Promoterregionen von ANP und BNP mittels ChIP Analysen, allerdings gelang keine Detektion eines suffizienten Signals, was möglicherweise auf eine unzureichende ChIP-Qualität des Antikörpers oder insgesamt geringe Proteinmengen in der Promotorregion zurückzuführen sein könnte. Weitere *in vitro* Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass HDAC4 mit SUV39H1 im Nukleus einen Komplex eingeht, der vermutlich SUV39H1 in der Nähe der Promoterregion hält und hierüber eine H3K9-Methylierung aufrecht hält (Hohl *et al.*, 2013). Durch CaMKII-induzierte HDAC4-Phosphorylierung und nachfolgenden nukleären Export kommt es zur Dissoziation des HDAC4-SUV39H1-Komplexes, was eine Abnahme der H3K9-Methylierung mitbedingen könnte (Hohl *et al.*, 2013).

Als Histon-Demethylasen wurden LSD1, JMJD1A und JMJD2A untersucht. LSD1 demethyliert H3K9me1/2 und H3K4me1/2 (Shi *et al.*, 2004). Des Weiteren entfernt das Enzym unter Komplexbildung mit Androgen-Rezeptoren Methylgruppen von H3K9me3 und aktiviert auf diese Weise die Transkription (Bártová *et al.*, 2008). Die Muster der H3-Acetylierung und H3K4-Trimethylierung waren in den von Bernstein *et al.* untersuchten Zelllinien nahezu identisch (Bernstein *et al.*, 2007). Die unveränderte Expression von LSD1 im humanen Myokard und die gleichbleibende H3K4-Methylierung lassen den Schluss zu, dass der Einfluss der LSD1 auf Histon-Modifikationen im LV-Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz eher von untergeordneter Bedeutung ist.

Die Histon-Demethylase JMJD1A entfernt spezifisch Methylreste von H3K9me1/2 (Liu *et al.*, 2009). Sie trägt somit zur Genaktivierung bei. In embryonalen Stammzellen führt ein shRNA-Knockdown der JMJD1A zu einer verstärkten H3K9me2-Methylierung, Reduktion der zellulären Pluripotenzmarker und Induktion von Zelldifferenzierung (Loh *et al.*, 2007). Es ist bekannt, dass die Transkription der mRNA von JMJD1A durch den Hypoxie-induzierten Faktor-1 (HIF-1) gesteigert wird (Wellmann *et al.*, 2008). HIF-1 ist ein Regulator der Sauerstoff-abhängigen Genexpression (Wenger, 2002). Hypoxie-responsive Gene sind funktionell mit Glykolyse verbunden und HIF-1 interagiert mit der JMJD1A als Enhancer von GLUT3 (Mimura *et al.*, 2012). Die gesteigerte Genexpression der JMJD1A bei unveränderter Bindung an die Promotorregionen der natriuretischen Gene könnte somit eine metabolische Reaktion des druckbelasteten Myokards darstellen.

Methylreste von H3K9me3 werden auch von der JMJD2A entfernt, wodurch es zur Genaktivierung kommt. Im insuffizienten humanen Myokard von Patienten mit ICM oder DCM wurde eine gesteigerte JMJD2A-Genexpression detektiert. Eine Subgruppenanalyse zeigte Unterschiede im Bindungsverhalten an den ANP-Promotor zwischen der DCM- und ICM-Gruppe. Bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) wurde ein deutlicher Trend zu einer vermehrten Assoziation von JMJD2A an die Promoterregion von ANP festgestellt. Obwohl bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie zum Zeitpunkt der Transplantation gewöhnlich keine akute Ischämie vorliegt, könnte man dennoch spekulieren, dass die ischämische Genese der Kardiomyopathie bzw. rekurrent auftretende, geringere Ischämien eine HIF1 α -Aktivierung und hierdurch erhöhte JMJD2A-Expression und Rekrutierung – auch chronisch – unterhalten könnten (Rose *et al.*, 2010).

HIF-1 besteht aus mehreren Untereinheiten, HIF-1- α und - β . HIF-1- α wird kontinuierlich im Proteasom der Zelle abgebaut, unter Hypoxie wird es stabilisiert und beeinflusst die Transkription positiv zum Beispiel durch Interaktion mit P300 (Wiesener, 2003). In perinekrotischen Arealen der Niere wurde eine Aktivierung von HIF-1 α nachgewiesen (Wiesener, 2003). Die HIF-1 α - JMJD2A Interaktion könnte der Grund für die gesteigerte Bindung in der Promotorregion von ANP im Myokard von Patienten mit ICM sein.

Dass die JMJD2A bei Patienten mit hypertropher Kardiomyopathie heraufreguliert ist, wurde von Zhang *et al.* 2011 beschrieben (Zhang *et al.*, 2011). Zhang *et al.* (2011) verwendeten Gewebe von Patienten mit hyperthropher Kardiomyopathie (HCM). Da es in der HCM zu einer Zunahme der Wanddicke des Ventrikels kommt und dieses Myokard auf Grund der Wandstärke wahrscheinlich subendokardial minderoxygeniert ist, ist ein Vergleich von hyperthropher Kardiomyopathie (HCM) mit der DCM und ICM nur eingeschränkt aussagekräftig.

6.2 Dynamische Regulation der H3K9-Methylierung

Histon-Methylierungen sind, ähnlich wie Acetylierung, eine schnelle Reaktion auf äußere Einflüsse. Eine Studie zeigte, dass eine 4-stündige Stimulation von DC-Zellen (Dendritic cells) mit LPS zu einer Aktivierung pro-inflammatorischer Gene führte. Dies war mit einer Demethylierung von H3K9 und einer verminderten Rekrutierung der mRNA-Polymerase II an die jeweiligen Promotorregionen gekennzeichnet (Saccani und Natoli, 2002). Um den Einfluss einer erhöhten kardialen Vorlast und Nachlast auf die Entstehung der Herzinsuffizienz, wie von Aurigemma et al. 2006 beschrieben, eingehender zu untersuchen und um mögliche Parallelen zwischen der akuten Belastung und dem langfristigen Remodeling zu eruieren, wurden Experimente an isoliert schlagenden Mäuseherzen durchgeführt („Working-Heart“-Model). Die Dynamik, mit der sich die geänderten Lastbedingungen in der Genexpression widerspiegeln, verdeutlicht die Zeitreihe in Abb. 24. Es konnte gezeigt werden, dass es in dieser Zeit zu einer Abnahme sowohl der Di- als auch der Tri-Methylierung von H3K9 in der Promotorregion von ANP kommt. Außerdem wurde eine Dissoziation des an H3K9me3 bindenden Proteins HP1 aus der Promotorregion von ANP registriert.

Die Ergebnisse der Experimente konstatieren, dass eine erhöhte kardiale Vorlast und Nachlast schon nach 60 Minuten zu einer Öffnung der Chromatinstruktur führt. Darüber hinaus suggerieren die Ergebnisse an Herzen mit akuter Vor- oder Nachlast-Erhöhung sowie von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, dass sich die akut regulierten Histon-Modifikationen chronisch manifestieren können. Die Geschwindigkeit, mit der das Chromatin auf die veränderte Hämodynamik reagiert, deutet auf kumulative Effekte der geänderten Genexpression und Chromatinstruktur bei der Entstehung der Herzinsuffizienz hin.

6.3 Die regulatorische Rolle von HDAC4

Bei der Entstehung der Herzinsuffizienz führt die anhaltende neuroendokrine Aktivierung durch das sympathische Nervensystem zu einer permanenten Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Protein Kinase II (CaMKII) und somit zur Phosphorylierung von HDAC4 und dessen Export aus dem Nukleus (Calalb *et al.*, 2009). Um den Einfluss der HDAC4 auf die Entstehung der Herzinsuffizienz näher zu untersuchen, verwendeten wir Mäuse mit Kardiomyozyten-spezifischer Deletion von HDAC4 (HDAC4-KO) und deren Geschwistertiere (WT), die durch eine Kooperation mit Prof. J. Backs aus Heidelberg zur Verfügung gestellt wurden. Unter physiologischen Lastbedingungen haben die HDAC4-KO-Mäuse ähnliche LV-systolische und diastolische Funktionsparameter wie die WT-Kontrollen. In der WT-Gruppe konnte der druckinduzierte nukleäre Export von HDAC4 durch Western-Blots verifiziert werden.

Backs *et al.* beschrieben, dass ein Export von HDAC4 ins Zytosol mit der Hochregulation fetaler Gene korreliert (Backs *et al.*, 2006). In dem von uns gewählten HDAC4-KO-Model zeigte sich bereits basal eine signifikant erhöhte ANP-Genexpression (Abb. 27), die mit einer erniedrigten

H3K9-Methylierung assoziiert war. Diese nahm unter erhöhter Vorlast paradoxer Weise ab. In Übereinstimmung damit erhöhte sich die Di- und Trimethylierung von H3K9 in der Promotorregion von ANP, während sich die Trimethylierung von H3K9 in den WT-Mäusen verringerte (Abb. 28). Dies spricht für eine verstärkte Kondensation der Chromatinstruktur in den HDAC4-KO-Mäusen unter akuter Belastung und für eine Öffnung des Chromatins als pathophysiologische Reaktion in den WT-Mäusen. Die beobachtete Zunahme der Bindung von HP1 in HDAC4-KO-Herzen, die einer erhöhten Vorlast ausgesetzt waren, stützt diese Vermutung.

Die Rolle von HDAC4 als Deacetylase ist schon lange Gegenstand der Forschung. Bisher wurde HDAC4 jedoch kaum als signal-abhängiges „Adapter“-Molekül betrachtet. Durch Zhang *et al.* wurde unter *in vitro*-Bedingungen in COS-Zellen zwar ein Ko-Repressor-Komplex, bestehend aus HP1, SUV39H1 und HDAC4 nachgewiesen (Zhang *et al.*, 2002), aber das Augenmerk wurde auf vermehrte Acetylierung von H3 (α -AcH3(K9/K14)) gelegt, die in den von Zhang *et al.* gezeigten Versuchen zunahm.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen HDAC4-Export, HP1-Dissoziation und Demethylierung von H3K9 könnte in der von Zhang *et al.* beschriebenen Assoziation zwischen diesen beiden Proteinen mit der Methyltransferase SUV39H1 bestehen. Das Fehlen dieses Repressor-Komplexes in den HDAC4-KO-Mäusen könnte der Histon-Methyltransferase SUV39H1 den Zugang zum Lysin-Rest von H3K9 erleichtern. Da auch die Methyltransferasen an sich noch modifiziert werden können, könnte unter dem Reiz einer erhöhten Vorlast die Aktivität der SUV39H1, durch beispielsweise SIRT1, gesteigert werden. SIRT1 interagiert direkt, rekrutiert und deacetyliert SUV39H1 und führt so zu einer höheren Zahl von H3K9me3-Modifikationen und erhöhter SUV39H1-Aktivität. Der Verlust der SIRT1 beeinflusst stark SUV39H1-abhängige H3K9-Methylierung und beeinträchtigt die Lokalisation von HP1 (Vaquero *et al.*, 2007). Das könnte eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Methylierung an H3K9 in der HDAC4-KO-Maus unter erhöhter Vorlast sein. Durch das Fehlen von HDAC4 in den Knock-out-Tieren könnte HP1 in der Promotorregion der natriuretischen Proteine akkumulieren und so die Rekrutierung von SUV39H1 beeinträchtigen. Eine weitere Möglichkeit für den basal erniedrigten H3K9me3-Spiegel könnte der „relativ“ unbeeinträchtigte Zugang von Demethylasen, wie der JMJD2A, zu den trimethylierten Lysinresten 9 von H3 sein. Um das Zusammenspiel dieses Ko-Repressor-Komplexes in allen Einzelheiten zu verstehen, bedarf es noch weiterer Forschungsarbeit. Man kann jedoch konstatieren, dass HDAC4 ein elementarer Bestandteil der physiologischen Reaktion des Herzens auf geänderte Druckverhältnisse ist. HDAC4 wird benötigt für die Vorlast-induzierte Demethylierung von H3K9me3, es vermittelt die Dissoziation von HP1 aus der Promotorregion von ANP und dies führt zu einer Auflockerung des Chromatins und Steigerung der ANP-Expression.

Als möglicher Mechanismus hierfür kommt die oben beschriebene und in Arbeiten unserer Gruppe identifizierte Interaktion zwischen HDAC4 und SUV39H1 in Frage. Die kausale Beteiligung weiterer Histon-Demethylasen und/oder -Methyltransferasen gilt es noch näher zu untersuchen. Genauso wichtig wird es sein, die Geschwindigkeit einer eventuellen Re-Methylierung zu quantifizieren. Dies wäre nötig, um den bestmöglichen Interventionszeitpunkt für eine medikamentöse Therapie, zum Beispiel mit HDAC-Inhibitoren, festzustellen.

6.4 Ausblick

Die Liste der zur Verfügung stehenden Medikamente, die als HDAC-Inhibitoren eingesetzt werden können, ist lang und umfasst viele, zum Teil sehr unspezifisch wirksame Präparate. So verhält es sich auch mit den möglichen Anwendungsgebieten. HDAC-Inhibitoren verringern zum Beispiel den Reperfusionsschaden, der am ischämischen Myokard entstehen kann (Granger *et al.*, 2008). Es stellt sich die Frage, ob sie auch als mögliche Therapieoption bei Herzinsuffizienz oder anderen Erkrankungen, die mit einer erhöhten Last einhergehen, wie zum Beispiel der pulmonalen Hypertonie, angewandt werden können. Kong *et al.* beobachteten tatsächlich eine antihypertrophe Wirkung des unspezifischen HDAC-Inhibitors TSA in tierexperimentellen Studien (Kong *et al.*, 2006). Bei den Versuchstieren wurde eine Aortenkonstriktion durchgeführt und die Interventionsgruppe mit TSA behandelt. TSA verhinderte die kardiale Hypertrophie und die Verschlechterung der LV-Funktion. In erster Linie wurden diese positiven Effekte der Inhibierung von Klasse I-HDACs zugeschrieben. TSA blockiert auch das von uns untersuchte HDAC4 (Miska *et al.*, 1999). Ein weiterer und gleichzeitig einer der ältesten klinisch genutzten HDAC-Inhibitoren ist die Valproin-Säure, die vor allem in der Neurologie zur Therapie epileptischer Anfälle verwendet wird. Allerdings ist die Anwendung von HDAC-Inhibitoren mit Nebenwirkungen behaftet (Mo *et al.*, 1999). Das Tributyrin, ein weiterer HDAC-Inhibitor, wird in der Mikrobiologie zur Herstellung von Agar-Platten verwendet. Für Valproin-Säure und Tributyrin wurde *in vitro* an Kardiomyozyten nachgewiesen, dass sie Wachstumsstillstand sowie Differenzierung induzieren und außerdem die Hypertrophie stoppen (Phiel *et al.*, 2001; Antos *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2011).

In der Herzinsuffizienz wurde vielfach eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beschrieben (Maack *et al.*, 2003). Die entstehenden Sauerstoffradikale verursachen oxidative DNA-Schäden, unter anderem an der Mitochondrien-DNA (mtDNA) (Hemnani und Parihar, 1998). Es wurde aber auch eine substantielle Mitochondrien-Zellkern-Interaktion dieser ROS-Effekte im alternden und insuffizienten Herz beschrieben (Marín-García *et al.*, 2006). Für die CaMKII wurden oxidationsabhängige Modifikationen durch reaktive Sauerstoffspezies beschrieben. Aber auch die Aktivierung der CaMKII führt zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Nishio *et al.*, 2012).

HDAC4 wird selbst durch reaktive Sauerstoffspezies oxidiert und bildet daraufhin intramolekulare Disulfidbrücken aus. In diesem oxidierten Zustand wird der Kernexport von HDAC 4 favorisiert (Ago T *et al.*, 2008; Erickson JR *et al.*, 2008). Es wäre interessant, diese ROS-Effekte auf die Genregulation prohyperthropher Gene genauer zu untersuchen. Auch wären weitere Untersuchungen zu den redox-sensitiven Mechanismen der CaMKII-Signalkaskade sinnvoll, um mögliche Interventionspunkte zu identifizieren. Da HDACs und HP1 Teil der CaMKII-Signalkaskade und an der DNA-Reperatur beteiligt sind, wäre es weiterhin interessant herauszufinden, welche Rolle die Histon-Methylierung dabei spielt (Robert *et al.*, 2011). Schließlich könnte noch untersucht werden, wie sich eine Inhibition der HDAC4/CaMKII-Signalkaskade auf den DNA-damage-response (DDR) der aufgelockerten Chromatinstruktur auswirkt.

Schlussfolgerungen

Die Daten der vorliegenden Arbeiten zeigen, dass bei chronischer Herzinsuffizienz epigenetische Modifikationen einen wichtigen Einfluss auf die Reaktivierung fetaler Gene, wie z. B. ANP und BNP, haben. Eine hervorzuhebende Rolle kommt hierbei der Abnahme der Di- und Trimethylierung von H3K9 zu, welche kausal durch HDAC4 reguliert wird. Arbeiten jenseits dieser Promotion weisen auf die Interaktion zwischen HDAC4 und der Histon Methyltransferase SUV39H1 als zugrundeliegenden Mechanismus hin. Darüber hinaus zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die Heraufregulation der H3K9-spezifischen Histon-Demethylasen JMJD1 und JMJD2 im menschlichen insuffizienten Myokard die H3K9-Demethylierung verstärken könnte. Die H3K9-Methylierung ist bei veränderten hämodynamischen Lastbedingungen ein dynamischer epigenetischer Regulationsmechanismus, der die Genexpression von ANP nachhaltig beeinflusst. Die neuartigen Einblicke in die epigenetische Regulation bei Herzinsuffizienz könnte die Entwicklung neuer Therapieverfahren erleichtern, die die Reaktivierung maladaptiver Gene und somit das kardiale Remodeling bei Herzinsuffizienz günstig beeinflussen könnten.

Literaturverzeichnis

1. Aagaard L, Laible G, Selenko P, Schmid M, Dorn R, Schotta G, Kuhfittig S, Wolf A, Lebersorger A, Singh PB, Reuter G, Jenuwein T (1999) Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31. *The EMBO Journal* 18: 1923 – 1938
2. Agger K, Christensen J, Cloos PA, Helin K (2008) The emerging functions of histone demethylases. *Curr. Opin. Genet.* 18:1–10
3. Ago T, Liu T, Zhai P, Chen W, Li H, Molkentin JD, Vatner SF, Sadoshima J (2008) A redox-dependent pathway for regulating class II HDACs and cardiac hypertrophy. *Cell* 133:978-993
4. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of rna synthesis *Proc Natl Acad Sci U S A.* 51: 786–794
5. Allis CD, Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwien T, Kouzarides T, Pillus L, Reinberg D, Shi Y, Shiekhhattar R (2007) New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 131: 633–636
6. Anker SD, Ponikowski PP, Clark AL, Leyva F, Rauchhaus M, Kemp M, Teixeira MM, Hellewell PG, Hooper J, Poole-Wilson PA, Coats AJ (1999) Cytokines and neurohormones relating to body composition alterations in the wasting syndrome of chronic heart failure. *Eur Heart J.* 20:683-693
7. Anup KU, Xiaodong C (2011) Dynamics of Histone Lysine Methylation: Structures of Methyl Writers and Eraser *Prog Drug Res.* 67: 107–124
8. Antos CL, McKinsey TA, Dreitz M, Hollingsworth L, Zhang CL, Schreiber K, Rindt H, Gorczynski RJ, Olson EN (2003) Dose-dependent blockade to cardiomyocyte hypertrophy by histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem.* 278: 28930–28937
9. Aurigemma GP, Zile MR, Gaasch WH (2006) Contractile Behavior of the Left Ventricle in Diastolic Heart Failure : With Emphasis on Regional Systolic Function *Circulation* 113:296-304
10. Backs J, Song K, Bezprozvannaya S, Chang S, Olson EN (2006) CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy *J Clin Invest.* 116: 1853–1864
11. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T (2001) . Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410:120-124
12. Bártoová E, Krejčí J, Harničarová A, Galiová G, Kozubek S (2008) Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review *J Histochem Cytochem.* 56: 711–721

13. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007) "High-resolution profiling of histone methylations in the human genome" *Cell* 129 : 823–837
14. Bergmann JH, Rodríguez MG, Martins NMC, Kimura H, Kelly DA, Masumoto H, Larionov V, Jansen LET, Earnshaw WC (2011) Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore *EMBO J.* 30: 328–340.doi: 10.1038/emboj.2010.329
15. Benevolenskaya EV (2007) "Histone H3K4 demethylases are essential in development and differentiation". *Biochem. Cell Biol.* 85 : 435–443
16. Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Kouzarides T, Schreiber SL (2002) Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:8695–8700
17. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007) The Mammalian Epigenome *Cell* 128:669-681
18. Boontje NM, Merkus D, Zaremba R, Versteilen A, de Waard MC, Mearini G, de Beer VJ, Carrier L, Walker LA, Niessen HW, Dobrev D, Stienen GJ, Duncker DJ, van der Velden J (2011) Enhanced myofilament responsiveness upon β -adrenergic stimulation in post-infarct remodeled myocardium *J Mol Cell Cardiol.* 50:487-99
19. Brasher SV, Smith BO, Fogh RH, Nietlispach D, Thiru A, Nielsen PR, Broadhurst RW, Ball LJ, Murzina NV, Laue ED (2000) The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *EMBO J.* 19(7):1587-97
20. Brutsaert DL, De Keulenaer GW (2006) Diastolic heart failure: a myth. *Curr Opin Cardiol* 21:240–248
21. Calalb MB, McKinsey TA, Newkirk S, Huynh K, Sucharov CC, Bristow MR (2009) Increased phosphorylation-dependent nuclear export of class II histone deacetylases in failing human heart. *Clin Transl Sci* 2:325-332
22. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GE, Lopes Fda S, Sugizaki MM, Nogueira CR, Pai-Silva MD (2006) Heart failure alters MyoD and MRF4 expressions in rat skeletal muscle *Int J Exp Pathol.* 87:219-225
23. Cao DJ, Wang ZV, Battiprolu PK, Jiang N, Morales CR, Kong Y, Rothermel BA, Gillette TG, Hill JA (2011) Histone deacetylase (HDAC) inhibitors attenuate cardiac hypertrophy by suppressing autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:4123-4128
24. Chaturvedi CP, Hosey AM, Palii C, Perez-Iratxeta C, Nakatani Y, Ranish JA, Dilworth J, Brand M (2009) Dual role for the methyltransferase G9a in the maintenance of β -globin gene transcription in adult erythroid cells *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 18303–18308

25. Chambeyron S, Bickmore WA (2004) Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription. *Genes Dev* 18:1119–1130
26. Chen H, Yan Y, Davidson TL, Shinkai Y, Costa M (2006) Hypoxic stress induces dimethylated histone H3 lysine 9 through histone methyltransferase G9a in mammalian cells. *Cancer Res.* 66:9009-9016
27. Chen Z, Zang J, Whetstine J, Hong X, Davrazou F, Kutateladze TG, Simpson M, Mao Q, Pan CH, Dai S, Hagman J, Hansen K, Shi Y, Zhang G (2006) Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell* 125: 691–702
28. Copeland O, Nowak KJ, Laing NG, Ravenscroft G, Messer AE, Bayliss CR, Marston SB (2010) Investigation of changes in skeletal muscle alpha-actin expression in normal and pathological human and mouse hearts. *J Muscle Res Cell Motil.* 31:207-214
29. Couture JF, Collazo E, Ortiz-Tello PA, Brunzelle JS, Trievel RC (2007) Specificity and mechanism of JMJD2A, a trimethyllysine-specific histone demethylase. *Nat Struct Mol Biol* 14:689–695
30. Couture JF, Trievel RC (2006) Histone-modifying enzymes: encrypting an enigmatic epigenetic code. *Curr Opin Struct Biol* 16:753–760
31. Dann CE, Bruick RK (2005) Dioxygenases as O₂-dependent regulators of the hypoxic response pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 338:639–647
32. Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X. (2005) The SET-domain protein superfamily: protein lysinemethyltransferases. *Genome Biol* 6:227
33. Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME (2008) A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* 133:462-474
34. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure (2008) *European Heart Journal* 29: 2388–2442
35. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure (2012) *European Heart Journal* 33, 1787–1847
36. Falnes PO, Johansen RF, Seeberg E. (2002) AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* 419:178–182
37. Fischer T, Cui B, Dhakshnamoorthy J, Zhou M, Rubin C, Zofall M, Veenstra TD, Grewal SIS (2009) Diverse roles of HP1 proteins in heterochromatin assembly and functions in fission yeast *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106: 8998–9003

38. Firestein R, Cui X, Huie P, Cleary ML Set Domain-Dependent Regulation of Transcriptional Silencing and Growth Control by SUV39H1, a Mammalian Ortholog of *Drosophila* Su(var)3-9 (2000) *Mol. Cell. Biol.* 13:4900-4909
39. Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T (2003) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 31:2305-12
40. Gaikwad AB, Sayyed SG, Lichtnekert J, Tikoo K, Anders HJ (2010) Renal failure increases cardiac histone h3 acetylation, dimethylation, and phosphorylation and the induction of cardiomyopathy-related genes in type 2 diabetes. *Am J Pathol.* 176:1079-1083
41. Gottlieb SS, Kukin ML, Ahern D, Packer M (1989) Prognostic importance of atrial natriuretic peptide in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 13:1534-1539
42. Granger A, Abdullah I, Huebner F, Stout A, Wang T, Huebner T, Epstein JA, Gruber PJ (2008) Histone deacetylase inhibition reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in mice *FASEB J.* 22: 3549–3560
43. Gray SG, Jia S (2007) Heterochromatin revisited *Nat Rev Genet.* 8:35-46
44. Gray SG, Iglesias AH, Lizcano F, Villanueva R, Camelo S, Jingu H, Teh BT, Koibuchi N, Chin WW, Kokkotou E, Dangond F (2005) Functional characterization of JMJD2A, a histone deacetylase- and retinoblastoma-binding protein. *J. Biol. Chem.* 280:28507–28518
45. Greil F, Kraan Ivd, Delrow J, Smothers JF, Wit Ed, Bussemaker HJ, Driel Rv, Henikoff S, Steensel Bv (2003) Distinct HP1 and Su(var)3-9 complexes bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location *Genes Dev* 17: 2825–2838
46. Gross P, Oelgeschläger T (2006) Core promoter-selective RNA polymerase II transcription *Biochem Soc Symp.* p 225-236
47. Haddad F, Jiang W, Bodell PW, Qin AX, Baldwin KM (2010) Cardiac myosin heavy chain gene regulation by thyroid hormone involves altered histone modifications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299:H1968-1980
48. Harris DM, Mills GD, Chen X, Kubo H, Berretta RM, Votaw VS, Santana LF, Houser SR (2005) Alterations in early action potential repolarization causes localized failure of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release. *Circ Res.* 96:543-550
49. Hemnani T, Parihar MS (1998) Reactive oxygen species and oxidative DNA damage *Indian J Physiol Pharmacol.* 42:440-52.
50. Hildmann C, Riester D, Schwienhorst A (2007) Histone deacetylases--an important class of cellular regulators with a variety of functions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75: 487–497

51. Huang J, Sengupta R, Espejo AB, Lee MG, Dorsey JA, Richter M, Opravil S, Shiekhatter R, Bedford MT, Jenuwein T, Berger SL (2007) p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature* 449:105–108
52. Huang Y, Fang J, Bedford MT, Zhang Y, Xu RM (2006) Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science* 312:748–751
53. Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293:1074-1080
54. Juven-Gershon T, Hsu JY, Theisen JW, Kadonaga JT (2008) The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. *Curr Opin Cell Biol.* 20:253-259
55. Kaneda R, Takada S, Yamashita Y, Choi YL, Nonaka-Sarukawa M, Soda M, Misawa Y, Isomura T, Shimada K, Mano H (2009) Genome-wide histone methylation profile for heart failure. *Genes Cells.* 14(1):69-77
56. Kim HJ, Seol JH, Han JW, Youn HD, Cho EJ (2007) Histone chaperones regulate histone exchange during transcription. *EMBO J.* 26: 4467–4474
57. Kim H, Heo K, Kim HJ, Kim K, Choi J (2009) Requirement of Histone Methyltransferase SMYD3 for Estrogen Receptor-mediated Transcription *Woojin AnJ Biol Chem.* 284: 19867–19877
58. Kimura H, Cook-PR (2001) Kinetics of Core Histones in Living Human Cells: Little Exchange of H3 and H4 and Some Rapid Exchange of H2b *J Cell Biol.* 153: 1341–1354
59. Kinoshita H, Kuwahara K, Takano M, Arai Y, Kuwabara Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Nakanishi M, Harada M, Fujiwara M, Murakami M, Ueshima K, Nakao K (2009) T-type Ca²⁺ channel blockade prevents sudden death in mice with heart failure. *Circulation.* 120:743-752
60. Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y (2006) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* 7:715–727
61. Klose RJ, Zhang Y (2007) Regulation of histone methylation by demethylation and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8: 307–318
62. Knapp G, Beckmann JS, Johnson PF, Fuhrman SA, Abelson J (1978) Transcription and processing of intervening sequences in yeast tRNA genes. *Cell* 14:221-236
63. Koch CM, Andrews RM, Flicek P, Dillon SC, Karaöz U, Clelland GK, Wilcox S, Beare DM, Fowler JC, Couttet P, James KD, Lefebvre GC, Bruce AW, Dovey OM, Ellis PD, Dhimi P, Langford CF, Weng Z, Birney E, Carter NP, Vetrie D, Dunham I (2007) "The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines". *Genome Res.* 17: 691–707
64. Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705

65. Kong Y, Tannous P, Lu G, Berenji K, Rothermel BA, Olson EN, Hill JA (2006) Suppression of class I and II histone deacetylases blunts pressure-overload cardiac hypertrophy. *Circulation* 113: 2579–2588
66. Kubo H, Margulies KB, Piacentino V 3rd, Gaughan JP, Houser SR (2001) Patients with end-stage congestive heart failure treated with beta-adrenergic receptor antagonists have improved ventricular myocyte calcium regulatory protein abundance. *Circulation*. 104:1012-8
67. Kuhn M (2012) Endothelial actions of atrial and B-type natriuretic peptides. *Br J Pharmacol*. 166:522-531
68. Kuwahara K, Saito Y, Takano M, Arai Y, Yasuno S, Nakagawa Y, Takahashi N, Adachi Y, Takemura G, Horie M, Miyamoto Y, Morisaki T, Kuratomi S, Noma A, Fujiwara H, Yoshimasa Y, Kinoshita H, Kawakami R, Kishimoto I, Nakanishi M, Usami S, Saito Y, Harada M, Nakao K (2003) NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. *EMBO J*. 22:6310-6321
69. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410:116-120
70. Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T (2003) An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci*. 116:2117-24
71. Lee MG, Wynder C, Cooch N, Shiekhata R (2005) An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* 437:432–435
72. Lee DY, Northrop JP, Kuo MH, Stallcup MR (2006) Histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a is a transcriptional coactivator for nuclear receptors *J Biol Chem*. 281: 8476–8485
73. Liu Z, Zhou S, Liao L, Chen X, Meistrich M, Xu J (2009) Jmjd1a demethylase-regulated histone modification is essential for cAMP-response element modulator-regulated gene expression and spermatogenesis. *J Biol Chem*. 285:2758-70
74. Ling BM, Bharathy N, Chung TK, Kok WK, Li S, Tan YH, Rao VK, Gopinadhan S, Sartorelli V, Walsh MJ, Taneja R (2012) Lysine methyltransferase G9a methylates the transcription factor MyoD and regulates skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:841-6
75. Loh YH, Zhang W, Chen X, George J, Ng HH (2007) Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev*. 21:2545-57
76. Lomberk G, Wallrath L, Urrutia R (2006) The heterochromatin protein 1 family. *Genome Biol* 7: 228
77. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251-260

78. Maisel AS, Krishnaswamy P, Nowak RM, McCord J, Hollander JE, Duc P, Omland T, Storrow AB, Abraham WT, Wu AH, Clopton P, Steg PG, Westheim A, Knudsen CW, Perez A, Kazanegra R, Herrmann HC, McCullough PA (2002) Rapid measurement of B-type natriuretic peptide in the emergency diagnosis of heart failure. *N Engl J Med* 347:161–167
79. Mal AK (2006) Histone methyltransferase Suv39h1 represses MyoD-stimulated myogenic differentiation. *EMBO J.* 25:3323-34
80. Marín-García J, Pi Y, Goldenthal MJ (2006) Mitochondrial-nuclear cross-talk in the aging and failing heart *Cardiovasc Drugs Ther.* 20:477-91
81. McDonagh TA, Morrison CE, Lawrence A, Ford I, Tunstall-Pedoe H, McMurray JJ, Dargie HJ (1997) Symptomatic and asymptomatic left-ventricular systolic dysfunction in an urban population. *Lancet* 350:829–833.
82. McKinsey TA (2007) Derepression of pathological cardiac genes by members of the CaM kinase superfamily. *Cardiovasc Res.* March 1; 73: 667–677
83. McKinsey TA, Zhang CL, Lu J, Olson EN (2000) Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation *Nature* 408(6808): 106–111
84. Melcher M, Schmid M, Aagaard L, Selenko P, Laible G, Jenuwein T (2000) Structure-function analysis of SUV39H1 reveals a dominant role in heterochromatin organization, chromosome segregation, and mitotic progression. *Mol Cell Biol.* p 3728-3741
85. Metra M, Nodari S, Parrinello G, Specchia C, Brentana L, Rocca P, Fracassi F, Bordonali T, Milani P, Danesi R, Verzura G, Chiari E, Dei Cas L (2007) The role of plasma biomarkers in acute heart failure. Serial changes and independent prognostic value of NT-proBNP and cardiac troponin-T. *Eur J Heart Fail* 9: 776–786
86. Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R, Schule R (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437:436–439
87. Miettinen KH, Lassus J, Harjola VP, Siirilä-Waris K, Melin J, Punnonen KR, Nieminen MS, Laakso M, Peuhkurinen KJ (2008) Prognostic role of pro- and anti-inflammatory cytokines and their polymorphisms in acute decompensated heart failure. *Eur J Heart Fail.*10:396-403

88. Mimura I, Nangaku M, Kanki Y, Tsutsumi S, Inoue T, Kohro T, Yamamoto S, Fujita T, Shimamura T, Suehiro J, Taguchi A, Kobayashi M, Tanimura K, Inagaki T, Tanaka T, Hamakubo T, Sakai J, Aburatani H, Kodama T, Wada Y (2012) Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A. *Mol Cell Biol.* 32:3018-3032
89. Miska E A, Karlsson C, Langley E, Nielsen S J, Pines J, Kouzarides T (1999) HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J.* 18: 5099–5107
90. Mo CN, Ladusans EJ (1999) Anomalous right pulmonary artery origins in association with the fetal valproate syndrome. *J Med Genet* 36 : 83-84
91. Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis.* 26:99-109
92. Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE (2001) Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412 : 561–565
93. Nishio S, Teshima Y, Takahashi N, Thuc LC, Saito S, Fukui A, Kume O, Fukunaga N, Hara M, Nakagawa M, Saikawa T (2012) Activation of CaMKII as a key regulator of reactive oxygen species production in diabetic rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 52:1103-1111
94. Nottke A, Colaiácovo MP, Shi Y (2009) Developmental roles of the histone lysine demethylases. *Development.* 136: 879–889
95. Palazzuoli A, Gallotta M, Quatrini I, Nuti R (2010) Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure *Vasc Health Risk Manag* 6: 411–418
96. Passarge E. *Color atlas of genetics.* 2nd ed. Thieme flexibook. Stuttgart, New York: Thieme; 2001, p 44
97. Peters AHFM, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schöfer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T (2001) Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability *Cell* 107 3 : 323 – 337
98. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS (2001) Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 276: 36734–36741
99. Potthoff MJ, Olson EN (2007) MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development.* 134:4131-40

100. Pritchard DJ, Korf BR (2003) Medical genetics at a glance. Blackwell Publishing, Birmingham, United Kingdom
101. Qian C, Zhou MM (2006) SET domain protein lysine methyltransferases: structure, specificity and catalysis. *Cell Mol Life Sci*;63:2755–2763
102. Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406:593–599
103. Riddle NC, Minoda A, Kharchenko PV, Alekseyenko AA, Schwartz YB, Tolstorukov MY, Gorchakov AA, Jaffe JD, Kennedy C, Linder-Basso D, Peach SE, Shanower G, Zheng H, Kuroda MI, Pirrotta V, Park PJ, Elgin SC, Karpen GH (2011) Plasticity in patterns of histone modifications and chromosomal proteins in *Drosophila* heterochromatin. *Genome Res.* 21:147-63
104. Robert T, Vanoli F, Chiolo I, Shubassi G, Bernstein KA, Rothstein R, Botrugno OA (2011) HDACs link the DNA damage response, processing of double-strand breaks and autophagy. *Nature* 471:74-79
105. Rose NR, Woon ECY, Kingham GL, King ONF, Mecinović J, Clifton IJ, Ng SS, Talib-Hardy J, Oppermann U, McDonough MA, Schofield CJ (2010) Selective Inhibitors of the JMJD2 Histone Demethylases: Combined Nondenaturing Mass Spectrometric Screening and Crystallographic Approaches. *J Med Chem.* 53: 1810–1818
106. Rosenfeld JA, Wang Z, Schones DE, Zhao K, DeSalle R, Zhang MQ (2009) Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome. *BMC Genomics* 31;10:143
107. Sacconi S, Natoli G (2002) Dynamic changes in histone H3 Lys 9 methylation occurring at tightly regulated inducible inflammatory genes. *Genes Dev.* 16:2219-2224
108. Sadaie M, Kawaguchi R, Ohtani Y, Arisaka F, Tanaka K, Shirahige K, Nakayama J (2008) Balance between distinct HP1 family proteins controls heterochromatin assembly in fission yeast. *Mol Cell Biol.* p 6973-88
109. Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3 *Nature* 419 : 407–411
110. Segall J, Matsui T, Roeder RG (1980) Multiple factors are required for the accurate transcription of purified genes by RNA polymerase III. *J Biol Chem.* 255:11986-11991
111. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119:941–953

112. Shi YJ, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T, Shi Y (2005) Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell* 19:857–864
113. Shi Y, Whetstone JR (2007) Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell* 25:1–14
114. Shin S, Janknecht R (2007) Activation of androgen receptor by histone demethylases JMJD2A and JMJD2D *Biochem Biophys Res Commun.* 359:742-6
115. Smale ST, Kadonaga JT (2003) The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem.* 72:449-79
116. Stein AB, Jones TA, Herron TJ, Patel SR, Day SM, Noujaim SF, Milstein ML, Klos M, Furspan PB, Jalife J, Dressler GR (2011) Loss of H3K4 methylation destabilizes gene expression patterns and physiological functions in adult murine cardiomyocytes. *J Clin Invest* 121:2641–2650
117. Sterner DE, Berger SL (2000) Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors *Berger Microbiol Mol Biol Rev.* 64: 435–459
118. Stewart MD, Li J, Wong J (2005) Relationship between Histone H3 Lysine 9 Methylation, Transcription Repression, and Heterochromatin Protein 1 Recruitment. *Mol Cell Biol.* 25: 2525–2538
119. Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T und Shinkai Y (2001) Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J. Biol. Chem.* 276: 25309–25317
120. Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y (2002) G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev.* 16:1779-1791
121. Treweek SC, Henshaw TF, Hausinger RP, Lindahl T, Sedgwick B (2002) Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature* 419:174–178
122. Troughton RW, Frampton CM, Yandle TG, Espiner EA, Nicholls MG, Richards AM (2000) Treatment of heart failure guided by plasma aminoterminal brain natriuretic peptide (N-BNP) concentrations. *Lancet* 355:1126–1130
123. Tsutsui H (2001) Oxidative stress in heart failure: the role of mitochondria. *Intern Med.* 40:1177-82

124. Neumann T, Biermann J, Neumann A, Wasem J, Ertl G, Dietz R, Erbel R (2009) Herzinsuffizienz: Häufigster Grund für Krankenhausaufenthalte Deutsches Ärzteblatt Heft 16
125. Ulucan O, Keskin O, Erman B, Gursoy A (2011) A comparative molecular dynamics study of methylation state specificity of JMJD2A. *PLoS One*. 6:e24664
126. Vaute O, Nicolas E, Vandel L, Trouche D (2002) Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases. *Nucleic Acids Res*. 15 30:475-81
127. Vaquero A, Sternglanz R, Reinberg D (2007) NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene* 26: 5505–5520
128. Vaquero A, Scher M, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Serrano L, Reinberg D (2007) SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* 450:440-444
129. Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA, Karsenty G, Olson EN (2004) Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell*. 119: 555–566
130. Verrier L, Escaffit F, Chailleux C, Trouche D, Vandromme M (2011) A new isoform of the histone demethylase JMJD2A/KDM4A is required for skeletal muscle differentiation. *PLoS Genet*. :e1001390
131. Villeneuve LM, Reddy MA, Lanting LL, Wang M, Meng L, Natarajan R (2008) Epigenetic histone H3 lysine 9 methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:9047-9052
132. Vogel MJ, Guelen L, de Wit E, Peric-Hupkes D, Lodén M, Talhout W, Feenstra M, Abbas B, Classen AK, van Steensel B (2006) Human heterochromatin proteins form large domains containing KRAB-ZNF genes. *Genome Res* 16 :1493–1504
133. Wang L, Zhang S, Zou C, Liu Z (2011) Differences in sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak characteristics between systolic and diastolic heart failure rabbit models. *Chin J Physiol*. 54:133-42
134. Wang AH, Bertos NR, Vezmar M, Pelletier N, Crosato M, Heng HH, Th'ng J, Han J, Yang XJ (1999) HDAC4, a Human Histone Deacetylase Related to Yeast HDA1, Is a Transcriptional Corepressor *Mol Cell Biol*. 19: 7816–7827
135. Wellmann S, Bettkober M, Zelmer A, Seeger K, Faigle M, Eltzhig HK, Buhrer C (2008) Hypoxia upregulates the histone demethylase JMJD1A via HIF-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 372 : 892-897

136. Wenger RH (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* 16:1151-62
137. Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M, Shi Y (2006) Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* 125: 467–481
138. Wiesener MS (2003) Mechanismen und Konsequenzen sauerstoffabhängiger Genregulation Habilitationsschrift Charité, Campus Virchow Klinikum S. 27-51
139. Yahi H, Fritsch L, Philipot O, Guasconi V, Souidi M, Robin P, Polesskaya A, Losson R, Harel-Bellan A, Ait-Si-Ali S (2008) Differential Cooperation between Heterochromatin Protein HP1 Isoforms and MyoD in Myoblasts *J Biol Chem.* 283: 23692–23700
140. Yamamoto K, Burnett JC Jr, Jougasaki M, Nishimura RA, Bailey KR, Saito Y, Nakao K, Redfield MM (1996) Superiority of brain natriuretic peptide as a hormonal marker of ventricular systolic and diastolic dysfunction and ventricular hypertrophy. *Hypertension* 28:988-994
141. Yu XY, Geng YJ, Liang JL, Zhang S, Lei HP, Zhong SL, Lin QX, Shan ZX, Lin SG, Li Y (2012) High levels of glucose induce "metabolic memory" in cardiomyocyte via epigenetic histone H3 lysine 9 methylation. *Mol Biol Rep.* 39:8891-8898
142. Zang MX, Li Y, Xue LX, Jia HT, Jing H (2004) Cooperative activation of atrial natriuretic peptide promoter by dHAND and MEF2C. *J Cell Biochem.* 93:1255-66
143. Zawel L, Reinberg D (1993) Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 44:67-108
144. Zile MR, Baicu CF, Gaasch WH. (2004) Diastolic heart failure: abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. *N Engl J Med.* 350:1953–1959
145. Zhang CL, McKinsey TA, Olson EN (2001) The transcriptional corepressor MITR is a signal-responsive inhibitor of myogenesis *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 7354–7359
146. Zhang CL, McKinsey TA, Olson EN (2002) Association of Class II Histone Deacetylases with Heterochromatin Protein 1: Potential Role for Histone Methylation in Control of Muscle Differentiation *Mol Cell Biol* 22:7302-7312
147. Zhang QJ, Chen HZ, Wang L, Liu DP, Hill JA, Liu ZP (2011) The histone trimethyllysine demethylase JMJD2A promotes cardiac hypertrophy in response to hypertrophic stimuli in mice *Clin Invest.* 121:2447–2456
148. Zhang Y, Reinberg D (2006) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 20:2343–2360

149. Zhou J, Wang Q, Chen LL, Carmichael GG (2008) On the mechanism of induction of heterochromatin by the RNA-binding protein vigilin. *RNA*. 14:1773-81

Veröffentlichung

Hohl M, Wagner M, Reil JC, Müller SA, Tauchnitz M, Zimmer AM, Lehmann LH, Thiel G, Böhm M, Backs J, Maack C (2013) HDAC4 controls histone methylation in response to elevated cardiac load. J Clin Invest. 123:1359-1370

Abstracts

Hohl M, Müller SA, Tauchnitz M, Zimmer AM, Ekici M, Backs J, Thiel G, Böhm M, Maack C (2010) Histone Acetylation is Not Required for Reactivation of ANP and BNP in Human Heart Failure Circulation 122: A16189

Müller SA, Hohl M, Reil JC, Tauchnitz M, Zimmer AM, Backs J, Neuberger HR, Böhm M, Maack C (2010) Histone acetylation is not required for upregulation of ANF after an increase in cardiac pre- or afterload despite nuclear export of histone deacetylase 4 Clin Res Cardiol 99, Suppl 1

Hohl M, Reil JC, Tauchnitz M, Zimmer AM, Mueller SA, Lehmann LH, Kreusser MM, Backs J, Böhm M, Maack C (2011) Nuclear export of HDAC4 mediates histone demethylation at H3K9 in the promoter region of ANF in response to elevated preload European Heart Journal 32 (Abstract Supplement), 663

Tauchnitz M, Hohl M, Reil JC, Müller SA, Zimmer AM, Lehmann LH, Kreußer MM, Böhm M, Backs J, Maack C (2011) Nuclear export of HDAC4 mediates histone demethylation at H3K9 in the promoter region of ANF in response to elevated cardiac preload Clin Res Cardiol 100, Suppl 1

Wagner M, Hohl M, Tauchnitz M, Zimmer AM, Böhm M, Maack C (2012) Upregulation of JmJc-domain containing histone demethylases contributes to ANP and BNP gene activation in human heart failure Clin Res Cardiol 101, Suppl 1

Reil JC, Tauchnitz M, Hohl M, Reil GH, Böhm M, Neuberger HR (2012) Aldosterone induces left atrial contractile dysfunction Clin Res Cardiol 101, Suppl 1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 LV diastolische Druck-Volumen-Beziehung.....	13
Abbildung 2 Struktur des Nukleosomens	16
Abbildung 3 CaMKII- HDAC4- Signalkaskade	20
Abbildung 4 Methylierungsreaktionen	22
Abbildung 5 Demethylierung durch die LSD1.....	24
Abbildung 6 Chromatinkondensation durch HP1.....	27
Abbildung 7 Zusammenspiel von Acetylierung und Methylierung.....	28
Abbildung 8 Der konditionale Gen-Knock-Out (KO)	31
Abbildung 9 Funktion eines Cre/loxP-Systems	32
Abbildung 10 HDAC4 –KO im Myokard der Versuchstiere	32
Abbildung 11 Primer Bindung am ANP und BNP Promotor in humanem Myokard	37
Abbildung 12 Primer Bindung am ANP Promotor in murinen Kardiomyozyten	38
Abbildung 13 Abgeschlossene Präparation des linken Vorhofs	44
Abbildung 14 Saline-Messung	45
Abbildung 15 Erhöhte ANP und BNP Genexpression in insuffizientem Myokard.....	51
Abbildung 16 H3K9 Demethylierung der ANP und BNP Promotorregionen im insuffizienten Myokard	52
Abbildung 17 Quantifizierung der H3K9 Demethylierung der ANP und BNP Promotorregionen im insuffizienten Myokard.....	53
Abbildung 18 Unveränderte H3K4 Di- und Trimethylierung in den ANP und BNP Promotorregionen im insuffizienten Myokard.....	54
Abbildung 19 Analyse von H3K4me2/me3 in humanem Myokard	55
Abbildung 20 : Abnahme der HP1-Bindung am ANP- und BNP-Promotor	56
Abbildung 21 Keine Änderung der G9a, SUV39H1 und LSD1-Genexpression	57
Abbildung 22 Gesteigerte Expression der Demethylasen JMJD1A und JMJD2A	58
Abbildung 23 Rekrutierung der JMJD2A an die ANP-Promotorregion bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie	59
Abbildung 24 Akute hämodynamische Belastung steigert die ANP-Genexpression	60
Abbildung 25 Eine erhöhte Vorlast induziert H3K9me2/me3 Demethylierung in der ANP-Promotorregion	61
Abbildung 26 Hämodynamische Belastung vermindert die HP1-Bindung am Promotor von ANP	62
Abbildung 27 Keine Erhöhung der ANP Genexpression in HDAC4- KO Mäusen.....	63
Abbildung 28 HDAC4 steuert H3K9-Demethylierung am ANP-Promotor	64
Abbildung 29 Zunahme der HP1-Bindung am Promotor von ANP	65

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Histon-Modifikationen	22
Tabelle 2 Histon-Demethylasen	24
Tabelle 3 Spender- Myokard	30
Tabelle 4 Thermocyclerprogramm	35
Tabelle 5 PCR-Protokoll für einen Ansatz	36
Tabelle 6 Primer für die forward und reverse Lesrichtung für GAPDH, ANP und BNP	36
Tabelle 7 Primer Maus	38
Tabelle 8 20µl RT-PCR - Ansatz	41
Tabelle 9 Working-Heart Parameter	46
Tabelle 10 Geräte	47
Tabelle 11 Chemikalien/Kits	48
Tabelle 12 Antikörper	49
Tabelle 13 Puffer	50

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Marcus Tauchnitz
Adresse:	Schützenstraße 9 66424 Homburg(Saar)
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum:	18.08.1984
Eltern:	Manuela Tauchnitz Armin Tauchnitz

Schulbildung und Studium

1991-1995	Grundschule an der Promenade Torgau
1995-2001	Johann-Walter Gymnasium Torgau
2001-2004	Berufliches Gymnasium Torgau
09/04-06/05	Zivildienst: Krankentransport Deutsches Rotes Kreuz
WS 05/06	Studiengang: Chemie Universität Leipzig
ab WS 06/07	Studiengang: Humanmedizin Universität des Saarlandes

PJ

08/11-12/11	Innere Medizin Homburg(Saar)
12/11-04/12	Chirurgie Homburg(Saar)
04/12-07/12	Radiologie Homburg(Saar)

Nebentätigkeiten

Hilfswissenschaftlicher Mitarbeiter:

2010-2011	Klinik für Innere Medizin III, AG Maack
2008-2010	Institut für Anatomie & Zellbiologie

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christoph Maack für die Bereitstellung der Thematik, seine hilfreichen Hinweise sowie die Zeit in seiner Arbeitsgruppe.

Bei Dr. Mathias Hohl und Dr. Jan Reil möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, die gute Arbeitsatmosphäre und die hervorragende Betreuung bedanken.

Außerdem danke ich dem gesamten Labor-Team, insbesondere Angela Mayumi Zimmer, Jeannette Zimolong, Lisa Lang, Michelle Gulentz, Michael Wagner, Nina Rebmann, Dr. Alexander Nickel und Dr. Michael Kohlhaas.

Mein Dank gilt darüber hinaus meinen Großeltern, Eltern, Maria und Mareike für die Unterstützung und Motivation.